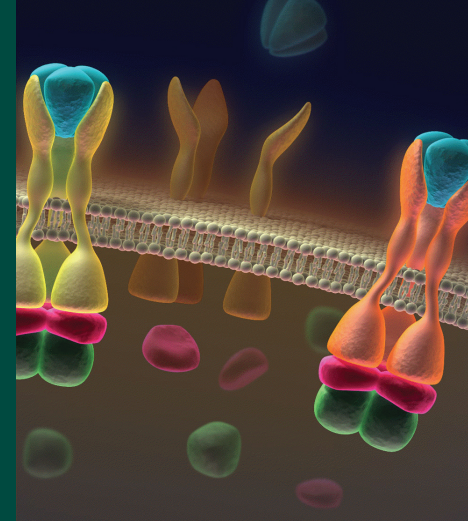


1

Μια εισαγωγή στους μοριακούς μηχανισμούς της μεταγωγής σήματος



1. Επεξεργασία δεδομένων από δίκτυα πρωτεϊνών

- 1.1 Πρωτεΐνες ως Διακόπτες
- 1.2 Ιδιωτικός ή δημόσιος χαρακτήρας της σηματοδότησης: Ενδοκρινής, παρακρινής, αυτοκρινής ή σηματοδότηση μέσω επαφής
- 1.3 Διασταυρούμενη επικοινωνία και πολυπλοκότητα των σηματοδοτικών δικτύων

2. Περιοχές αλληλεπίδρασης: πώς συγκροτείται το σηματοδοτικό δίκτυο

- 2.1 Πρωτεϊνικές περιοχές αλληλεπίδρασης
- 2.2 Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις
- 2.3 Περιοχές αγκυροβόλια (docking domains)
- 2.4 Πρωτεΐνες προσαρμογής και πρωτεΐνες σκαλωσιών
- 2.5 Το αίνιγμα της πολυπλοκότητας

3. Εφοδιασμός του δικτύου με ενέργεια: Βασική βιοχημεία της μεταγωγής σήματος

- 3.1 Μετα-μεταφραστικές ομοιοπολικές τροποποιήσεις
- 3.2 Αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και νιτροσυλίωσης ως διακόπτες: μια ισορροπία σε λεπτή γραμμή
- 3.3 Ένζυμα ως διακόπτες που υδρολύουν ενεργειακά πλούσιες χημικές ενώσεις
- 3.4 GTPάσες ή G-πρωτεΐνες ως διακόπτες
- 3.5 ATPάσες ως διακόπτες
- 3.6 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

- 3.7 Η ακετυλίωση πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση
- 3.8 Ουβικουιλίνωση πρωτεϊνών: κάτι περισσότερο από ένα μήνυμα πρωτεϊνικής αποικοδόμησης
- 3.9 Μονο- και πολυ(ADP-ριβοσυλίωση)
- 3.10 Το δυναμικό της μεμβράνης: μια πλούσια πηγή ενέργειας για τις κυτταρικές διαδικασίες
- 3.11 Η πρωτεόλυση ως διακόπτης: η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών παρέχει μόρια διαβιβαστές και ενέργεια
- 3.12 Υποδοχείς: πώς οι αντιδράσεις που παρέχουν ενέργεια συνδυάζονται με τη μεταγωγή σήματος

4. Εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια: ορμόνες, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες

- 4.1 Ορμόνες
- 4.2 Κυτοκίνες
- 4.3 Αυξητικοί παράγοντες
- 4.4 Νευροδιαβιβαστές
- 4.5 Το ATP και το cAMP ως εξωκυτταρικά μηνύματα
- 4.6 Φερομόνες: χημική επικοινωνία μεταξύ οργανισμών

5. Ενίσχυση του σήματος

- 5.1 Ενίσχυση του σήματος κατά τη διαδικασία της φωτοδιαβίβασης

6. Ρύθμιση της δια- και ενδο-κυτταρικής σηματοδότησης





1. Επεξεργασία δεδομένων από δίκτυα πρωτεϊνών

Οι ζωντανοί οργανισμοί είναι στενά συνδεδεμένοι με το περιβάλλον τους και δέχονται συνεχώς πολλά και σύνθετα ερεθίσματα. Η ικανότητα απόκρισης στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα είναι μία από τις βασικές ιδιότητες της ζωής. Τα διάφορα ερεθίσματα γίνονται αντιληπτά ως “σήματα εισόδου”. Στη συνέχεια, οι οργανισμοί δημιουργούν “σήματα εξόδου” και προσαρμόζουν τη συμπεριφορά τους στη δεδομένη κατάσταση του περιβάλλοντος, μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση, τον μεταβολισμό, την αναπαραγωγή, το σχήμα και την κινητικότητα τους. Αυτή η ικανότητα απόκρισης, η οποία είναι μια προϋπόθεση για την επιβίωση, αποτελεί ένα απαραίτητο χαρακτηριστικό σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Συνεπώς, οι οργανισμοί, από τον πιο απλό προκαρυώτη έως τον άνθρωπο, μπορούν να θεωρηθούν ως “συστήματα επεξεργασίας πληροφοριών”.

Η επεξεργασία των διαφορετικών σημάτων απαιτεί ένα **δίκτυο από μηχανισμούς-διακόπτες**, οι οποίοι θα παίρνουν αποφάσεις του τύπου Ναι/Όχι και θα είναι ικανοί να προσαρμόζονται και να μαθαίνουν. Τα δίκτυα μεταγωγής σήματος αποτελούνται από πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν τη μοναδική ικανότητα να επεξεργάζονται τα δεδομένα σύμφωνα με λογικές αρχές του τύπου Ναι/Όχι αλλάζοντας τη διαμόρφωσή τους και, κατά συνέπεια, τη λειτουργικότητά τους. Η καταπληκτική λειτουργική τους πολυμορφικότητα, η αξεπέραστη δομική τους ευελιξία και η ασύγκριτη ικανότητα επικοινωνίας της μιας με την άλλη, καθώς και με άλλα μόρια καθιστά τις πρωτεΐνες αποτελεσματικά στοιχεία διακόπτες ενός μοριακού δικτύου επεξεργασίας πληροφοριών. Οι πρωτεΐνες αυτού του δικτύου επικοινωνούν η μία με την άλλη μέσω ενός μικρού αριθμού απλών βιοχημικών αντιδράσεων. Η πολυπλοκότητα αυξάνεται από έναν απεριόριστο αριθμό συνδυασμών αποτελούμενο

από λίγα βασικά στοιχεία και όχι από έναν τεράστιο αριθμό από πολύπλοκες δομές και αντιδράσεις.

Καθώς οι πρωτεΐνες είναι ταυτόχρονα ένζυμα, ρυθμιστικοί παράγοντες και δομικά στοιχεία του κυττάρου, το δίκτυο από ενζυμικά καταλυόμενες μεταβολικές αντιδράσεις, αλλά και οι διεργασίες που ρυθμίζουν την κυτταρική αρχιτεκτονική και κινητικότητα, είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με το δίκτυο επεξεργασίας πληροφοριών. Μέσα σε ένα κύτταρο τίποτα δεν συμβαίνει που να μην είναι υπό τον έλεγχο αυτού του δικτύου.

Πίνακας 1.1

Τόσο οι ζωντανοί οργανισμοί όσο και τα κύτταρα είναι στενά συνδεδεμένοι με το περιβάλλον τους και δέχονται συνεχώς πολλά και σύνθετα ερεθίσματα

Περιβαλλοντικά ερεθίσματα: ήχος, φως, θερμοκρασία, άγγιγμα, γεύση και οσμή, μόρια ξενοβιοτικά, τοξικές ουσίες, άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες.

Μεταξύ οργανισμών: φερομόνες, φυλετικές ορμόνες, ήχος, όψη, άγγιγμα, γεύση, οσμή.

Μεταξύ κυττάρων: ορμόνες, φυτικές ορμόνες, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, νευροδιαβιβαστές, μονοξειδίο του αζώτου, ATP, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.

Εντός των κυττάρων: δεύτεροι διαβιβαστές (όπως τα κυκλικά νουκλεοτίδια, η διακυλογλυκερόλη, η τριφωσφορική ινοσιτόλη, τα φωσφοϊνσιτίδια, το Ca^{2+}) και οι περιοχές αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Εντός των πρωτεϊνικών μορίων: αλλαγές στη διαμόρφωση.

Εικόνα 1.1

Τα σήματα είναι διαφορεόμενα.

Όπως η οσμή ενός μέσου μεγέθους ζώου έχει αποτρεπτική επίδραση σε μικρά ζώα, αλλά ελκύει τα μεγαλύτερα ζώα, τα βιολογικά σήματα έχουν τελείως διαφορετικές σημασίες ανάλογα με το είδος του οργανισμού, τον τύπο του ιστού και το φυσιολογικό πλαίσιο, δηλαδή ανάλογα με το πρόγραμμα αποκωδικοποίησης του σήματος. Για παράδειγμα, στο βακτήριο *Escherichia coli* απουσία γλυκόζης και παρουσία λακτόζης αυξάνεται το cAMP, το οποίο δρα ως ενεργοποιητής ενός μεταγραφικού παράγοντα που συνδέεται στον επαγωγέα του οπερονίου *lac*, επάγοντας τον καταβολισμό της λακτόζης.

Στο πρώτιστο *Dictyostelium discoideum* η έλλειψη τροφικών αποθεμάτων οδηγεί στην απελευθέρωση cAMP από τον ιδρυτή της αποικίας στο περιβάλλον, προσελκύοντας γειτονικά *Dictyostelium* για τη δημιουργία σπασματομάματος.

Τέλος, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το cAMP έχει μεγάλο εύρος δράσεων ως δεύτερος διαβιβαστής, από τη γλυκογονόλυση έως την αποθήκευση της μνήμης.

Ο όρος μεταγωγή σήματος αναφέρεται στους μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους το κύτταρο επεξεργάζεται τις πληροφορίες που μεταφέρουν τα εξωτερικά ή τα εσωτερικά ερεθίσματα και δημιουργεί την κατάλληλη απόκριση που εξασφαλίζει με τον καλύτερο τρόπο την επιβίωσή του. **Μεταγωγή σήματος** είναι η διαδικασία της αποκωδικοποίησης των σημάτων από τον δέκτη, παρόλο που η επεξεργασία σήματος θα ήταν ένας καταλληλότερος όρος.

Τα σήματα συχνά είναι διαφορεόμενα: το ίδιο σήμα μπορεί να έχει διαφορετικές σημασίες σε διαφορετικούς δέκτες. Για παράδειγμα, το σηματοδοτικό μόριο 3,5-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) ερμηνεύεται από πολλά βακτήρια ως αίτημα για ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων (βλ. σσ. 273-275), από το



cAMP

- | | |
|------------------------|---|
| — Προκαρυώτες | — Μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής |
| — <i>D. discoideum</i> | — Εξωκυτταρικό σήμα, επάγει συσσωμάτωση |
| — Ευκαρυώτες | — Δεύτερος διαβιβαστής με ποικίλη δράση |

Οιστραδιόλη

- | | |
|-------------------|--|
| — Μήτρα | — Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση |
| — Κόλπος | — Κερατινοποίηση επιθηλίου |
| — Εγκέφαλος | — Έλεγχος βιοσύνθεσης ορμονών |
| — Ωαγωγός ωοθήκης | — Σύνθεση ωοαλβουμίνης και άλλων πρωτεϊνών |
| — Ήπαρ | — Σύνθεση βιτελλογενίνης |

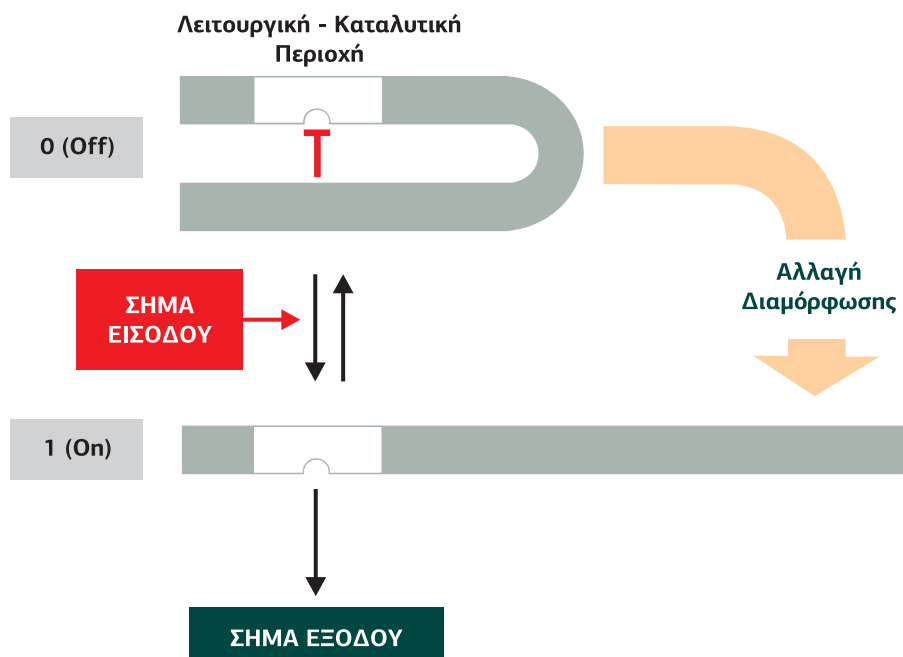
πρώτιστο *Dictyostelium discoideum* ερμηνεύεται ως σήμα για τη συσσωμάτωσή του σε πολυκυτταρικές δομές και για την ανάπτυξη σπορίων (βλ. σσ. 60-61), ενώ στα κύτταρα των σπονδυλωτών παίζει τον ρόλο του δεύτερου διαβιβαστή με διαφορετικά αποτελέσματα, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (βλ. σσ. 279-285). Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η οιστραδιόλη, μια ορμόνη των σπονδυλωτών, η οποία ανάλογα με τον ιστό έχει διαφορετικά αποτελέσματα (**Εικόνα 1.1**).

Φυσικά ισχύει και το αντίστροφο: διαφορετικά σήματα μπορούν να προκαλέσουν την ίδια απόκριση. Για παράδειγμα, δύο ορμόνες (η γλυκαγόνη στο ήπαρ και η αδρεναλίνη στους μύες) επάγουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Παρόλο που βασίζεται κυρίως σε βιοχημικές αντιδράσεις, η δια- και ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος ακολουθεί τους ίδιους κανόνες με τη γλώσσα, όπου τα σήματα (οι λέξεις και οι προτάσεις) έχουν κάποια έννοια μόνο γι' αυτούς που είναι καλοί γνώστες της γλώσσας ή κατέχουν το πρόγραμμα αποκωδικοποίησης.

1.1 | Πρωτεΐνες ως διακόπτες

Τα συστήματα επεξεργασίας πληροφοριών αποτελούνται από στοιχεία διακόπτες, οι οποίοι μετατρέπουν ένα σήμα εισόδου σε ένα σήμα εξόδου. Στην πιο απλή μορφή ένας διακόπτης αναπαριστά δύο τιμές: 0 (OFF) και 1 (ON) (**Εικόνα 1.2**). Οι πρωτεΐνες έχουν την ξεχωριστή ιδιότητα να υφίστανται σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές καταστάσεις (είτε ανενεργή κατάσταση 0 είτε ενεργή κατάσταση 1), οι οποίες διαφέρουν στην τριδιάστατη διαμόρφωση. Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνες μπορούν να παίξουν τον ρόλο του διακόπτη στα σηματοδοτικά μονοπάτια, επεξεργαζόμενες σήματα εισόδου, τα οποία μπορούν να αλλάξουν την ισορροπία μεταξύ 0 και 1 και συνεπώς τη λειτουργική κατάσταση της πρωτεΐνης. Ανάλογα με τον τύπο της πρωτεΐνης, τον ρόλο των σημάτων εισόδου μπορούν να παίξουν χημικοί προσδέτες ή άλλα ερεθίσματα, όπως η πίεση, το φως και η θερμοκρασία. Το σήμα εξόδου είναι το αποτέλεσμα που απορρέει από την τροποποιημένη λειτουργία της πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της είναι αποτέλεσμα της τροποποιημένης της διαμόρφωσης. Για παράδειγμα, ένα ένζυμο μετατρέπει το σήμα εισόδου “συγκέντρωση υποστρώματος” σε σήμα εξόδου “συγκέντρωση προϊόντος”.



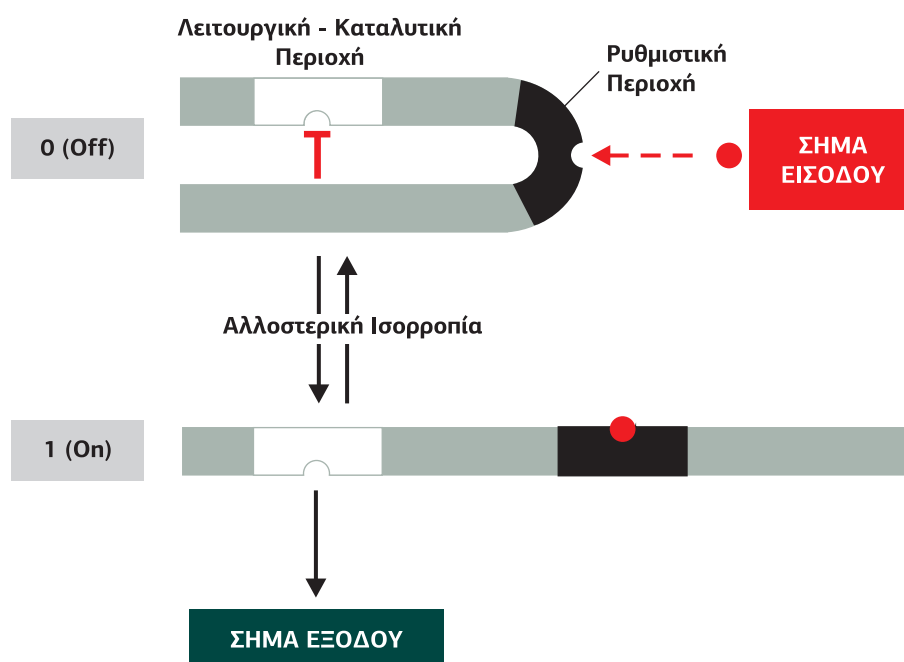
Εικόνα 1.2

Πρωτεΐνες ως διακόπτες.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες υφίστανται σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές λειτουργικές καταστάσεις (εδώ αποκαλούνται καταστάσεις 0 και 1), οι οποίες αντιπροσωπεύονται από διαφορετικές διαμορφώσεις. Στην κατάσταση 0 η πρωτεΐνη υποτίθεται ότι είναι ανενεργή (στην κλειστή ή off θέση), επειδή σ' αυτήν τη διαμόρφωση το ενεργό κέντρο μπλοκάρεται από μία ενδομοριακή αλληλεπίδραση. “Σήμα εισόδου” είναι κάθε επίδραση που μετατρέπει ή οδηγεί τη μία κατάσταση στην άλλη. Η αλλαγή στη διαμόρφωση αίρει την αυτο-αναστολή της πρωτεΐνης, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα “σήμα εξόδου” που παράγεται από το ενεργό κέντρο (άλλο σήμα μπορεί να προκαλέσει την αντίθετη 1→0 αλλαγή). Αυτή η στοιχειώδης μονάδα επεξεργασίας δεδομένων αποτελεί υπεραπλούστευση, επειδή μέσα στο κύτταρο οι πρωτεΐνες υφίστανται σε περισσότερες από δύο καταστάσεις ή διαμορφώσεις. [13]

Για τα περισσότερα ένζυμα τον ρόλο των σημάτων εισόδου, εκτός από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, μπορούν να παίξουν διεγέρτες ή αναστολείς, οι οποίοι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων. Αυτός ο τρόπος ρύθμισης, που ονομάζεται **αλλοστερική ρύθμιση**, ισχύει όχι μόνο για τα ένζυμα, αλλά και για πρωτεΐνες που περιέχουν ρυθμιστικές περιοχές, όπου συνδέονται οι διεγέρτες ή οι αναστολείς και μεταβάλλουν τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, επηρεάζοντας τη λειτουργία της. Το φαινόμενο του αλλοστερισμού θεωρεί ότι μια πρωτεΐνη υπάρχει σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία και διαφέρουν στις δραστηριότητες όπως και στις συγγενειές τους για τους ρυθμιστικούς παράγοντες, τους οποίους ας αποκαλέσουμε σήματα εισόδου **S** (Εικόνα 1.3). Το αλλοστερικό φαινόμενο είναι ένα φαινόμενο ON-OFF διακόπτη, με ανενεργή (0) και ενεργή κατάσταση (1).

Εικόνα 1.3
Αλλοστερικοί διακόπτες στη λειτουργία των πρωτεϊνών. Μια πρωτεΐνη με ξεχωριστή ρυθμιστική και καταλυτική περιοχή υφίσταται σε τουλάχιστον δύο διαμορφώσεις, 0 και 1, οι οποίες βρίσκονται σε μια αλλοστερική ισορροπία. Ένα διεγερτικό σήμα εισόδου (αγωνιστής) σταθεροποιεί τη διαμόρφωση 1. Αντιθέτως, ένα ανασταλτικό σήμα εισόδου (ανταγωνιστής) σταθεροποιεί τη διαμόρφωση 0 (δεν φαίνεται). [13]



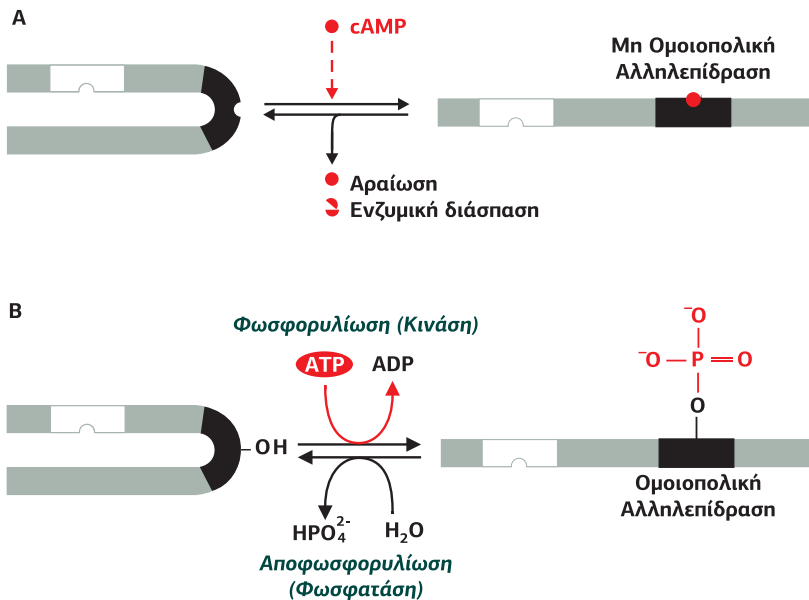
Ας υποθέσουμε ότι το **S** είναι το διεγερτικό σήμα ή, με φαρμακολογικούς όρους, ο **αγωνιστής**. Απουσία του **S** η πρωτεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι στη διαμόρφωση 0: ο διακόπτης είναι στη θέση OFF. Στην ορολογία της χημικής θερμοδυναμικής η διαμόρφωση 0 είναι κατάσταση χαμηλής ελεύθερης ενέργειας. Αυτό σημαίνει ότι η μετάβαση από το 0 στο 1 αποτελεί μια ενδόθερμη αντίδραση, η οποία δεν συντελείται αυθόρμητα αλλά απαιτεί ένα ποσό ενέργειας. Όταν το **S** αλληλεπιδρά με τη ρυθμιστική περιοχή της πρωτεΐνης, η ισορροπία μετατοπίζεται προς τη διαμόρφωση 1: ο διακόπτης γυρίζει στη κατάσταση ON, υπό την προϋπόθεση ότι το σηματοδοτικό μόριο **S** έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τη διαμόρφωση 1 σε σχέση με τη 0 και η ενέργεια που απελευθερώνεται με την πρόσδεση του **S** είναι αρκετή για να ωθήσει την αλλαγή της διαμόρφωσης.

Με τον ίδιο τρόπο επιδρά και ένα ανασταλτικό σήμα ή **ανταγωνιστής**, ο οποίος έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τη διαμόρφωση 0 σε σχέση με την 1 και κρατάει τον διακόπτη στη θέση OFF.

Τα διεγερτικά και τα ανασταλτικά σήματα είναι είτε μικρά μόρια και περιβαλλοντικά ερεθίσματα είτε πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες στόχους τους μέσω ειδικών περιοχών. Αυτές οι περιοχές είναι αλληλουχίες αμινοξέων που μπορούν να αναγνωρίσουν και να συνδεθούν με συμπληρωματικές αλληλουχίες της ίδιας (ενδομοριακή αλληλεπίδραση) ή διαφορετικής πρωτεΐνης (διαμοριακή αλληλεπίδραση). Η αλληλεπίδραση ενός σηματοδοτικού μορίου με μια πρωτεΐνη μπορεί να είναι ομοιοπολική ή μη ομοιοπολική. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών και άλλες

μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις εκπροσωπούν ομοιοπολική σύνδεση, ενώ η μη ομοιοπολική σύνδεση είναι χαρακτηριστική για την αλληλεπίδραση μιας ορμόνης με τον υποδοχέα της ή για τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Για να γυρίσει ο διακόπτης ξανά στο OFF, το διεγερτικό σήμα πρέπει να αφαιρεθεί. Μια αραίωση ή μια χημική απενεργοποίηση του σήματος είναι αρκετή για την αντιστροφή μιας μη ομοιοπολικής αντίδρασης, ενώ μια ομοιοπολική τροποποίηση απαιτεί τη χημική διάσπαση του σήματος, η οποία κατά κανόνα πρέπει να καταλυθεί από ένα συγκεκριμένο ένζυμο (**Εικόνα 1.4**).



Εικόνα 1.4

Αλληλεπιδράσεις σηματοδοτικών μορίων με πρωτεΐνες. Α. Σύνδεση του cAMP σε μια πρωτεΐνη ως παράδειγμα μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης. Το σήμα του cAMP “σβήνει” είτε λόγω αραίωσης είτε λόγω της ενζυμικής του διάσπασης, οδηγώντας την αντίδραση προς την αντίθετη κατεύθυνση. Με ανάλογο τρόπο, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και οι πρωτεΐνες. Β. Φωσφορυλίωση ως παράδειγμα μιας ομοιοπολικής αντίδρασης ή μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Οι αντιδράσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις απαιτούν ενζυμική κατάλυση. [13]

Όταν μια πρωτεΐνη αποτελείται από διάφορες υπομονάδες, η θεωρία του αλλοστερισμού προβλέπει **συνεργατικότητα**. Δηλαδή, η αλληλεπίδραση μιας υπομονάδας με το σηματοδοτικό μόριο είτε διευκολύνει (θετική συνεργατικότητα) είτε εμποδίζει (αρνητική συνεργατικότητα) την πρόσδεση επιπλέον σηματοδοτικών μορίων, με αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση των άλλων υπομονάδων.

Συνοψίζοντας, οι πρωτεΐνες μπορούν να αντιμετωπίζονται ως στοιχεία διακόπτες ενός μοριακού δικτύου επεξεργασίας δεδομένων. Η εναλλαγή ON-OFF οφείλεται σε μια αλλαγή διαμόρφωσης που επάγεται από ένα “σήμα εισόδου”. Ως αποτέλεσμα τροποποιείται η λειτουργία της πρωτεΐνης, η οποία αντανakλά το “σήμα εξόδου”. Η αλλαγή της διαμόρφωσης προκύπτει από μία ενδο- ή δια-μοριακή αλλοστερική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε μια ρυθμιστική περιοχή (η οποία δέχεται το σήμα εισόδου) και μια λειτουργική περιοχή (η οποία προωθεί το σήμα εξόδου).

1.2

Ιδιωτικός ή δημόσιος χαρακτήρας της σηματοδότησης: Ενδοκρινής, παρακρινής, αυτοκρινής ή σηματοδότηση μέσω επαφής

Τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους με σήματα, τα οποία μπορεί να έχουν ιδιωτικό χαρακτήρα, δηλαδή να απευθύνονται σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο ή μπορεί να έχουν δημόσιο χαρακτήρα, δηλαδή να απευθύνονται σε ένα σύνολο κυττάρων. Για παράδειγμα, το ενδοκρινές σύστημα έχει δημόσιο χαρακτήρα, με μεγάλη ακτίνα δράσης, ενώ το νευρικό σύστημα λειτουργεί κυρίως μέσω σημάτων ιδιωτικού χαρακτήρα, με μικρή ακτίνα δράσης. Το υψηλότερο επίπεδο ιδιωτικότητας συναντάται στα κύτταρα που επικοινωνούν μέσω προσδεμένων στη μεμβράνη σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Οι τέσσερις τρόποι διακυτταρικής επικοινωνίας, ανάλογα με την εμβέλεια μεταφοράς του σήματος (χημικού διαβιβαστή), συνοψίζονται

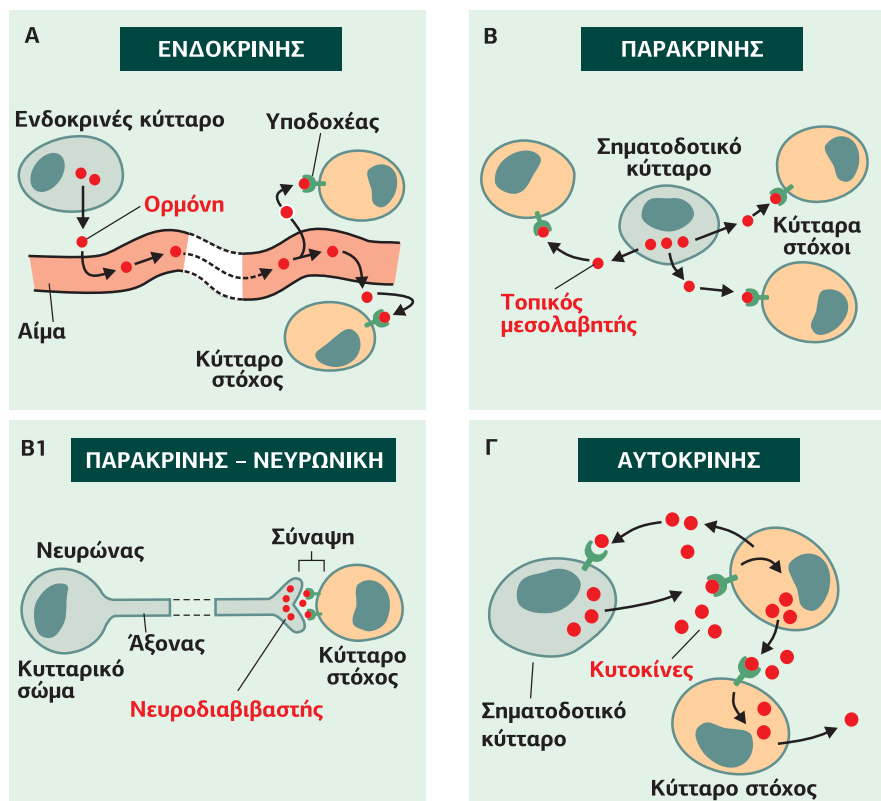
παρακάτω:

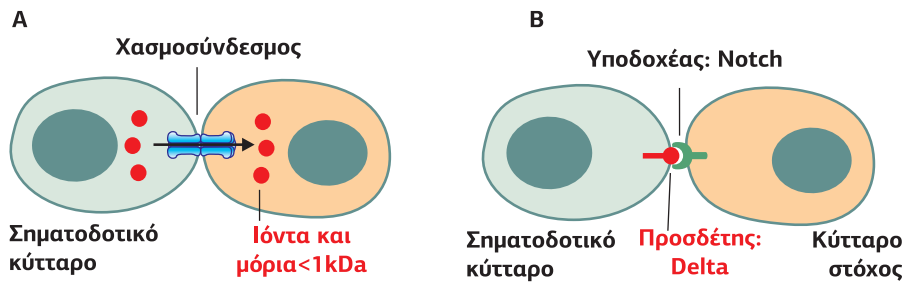
- 1. ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ:** Στην ενδοκρινή σηματοδότηση το σήμα “ορμόνη” παράγεται από εξειδικευμένα ενδοκρινή κύτταρα και απελευθερώνεται στο κυκλοφορικό σύστημα (αίμα). Μέσω του κυκλοφορικού συστήματος η ορμόνη κατανέμεται σε όλο τον οργανισμό, ακόμη και σε απομακρυσμένα σημεία του. Η ορμόνη αναγνωρίζει και συνδέεται στα συγκεκριμένα κύτταρα στόχους λόγω της ύπαρξης εξειδικευμένων υποδοχέων (**Εικόνα 1.5Α**). Τα φυτά χρησιμοποιούν ενδοκρινή σηματοδότηση, καθώς οι φυτικές ορμόνες μεταφέρονται μέσω του αγγειακού συστήματος του φυτού.
- 2. ΠΑΡΑΚΡΙΝΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ:** Η παρακρινής σηματοδότηση έχει περιορισμένη ακτίνα δράσης καθώς το σήμα από τα κύτταρα, όπου παράγεται, φτάνει στα κύτταρα στόχους μέσω παθητικής διάχυσης. Το κύτταρο που παράγει το σήμα πρέπει να βρίσκεται κοντά στο κύτταρο στόχο σε αυτού του τύπου τη σηματοδότηση (**Εικόνα 1.5Β**). Η σηματοδότηση είναι τοπική και οι διαβιβαστές οι οποίοι συμμετέχουν ονομάζονται **τοπικοί διαμεσολαβητές**. Μια ειδική κατηγορία παρακρινούς σηματοδότησης είναι η **συναπτική νευροδιαβίβαση**, στην οποία το νευρικό κύτταρο επικοινωνεί με τα κύτταρα στόχους του (νευρικά, μυϊκά, ενδοκρινή κ.ά.) στην περιοχή της σύναψης (**Εικόνα 1.5Β1**).
- 3. ΑΥΤΟΚΡΙΝΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ:** Στην αυτοκρινή σηματοδότηση κύτταρα του ίδιου τύπου επικοινωνούν μεταξύ τους. Το σήμα παράγεται από το σηματοδοτικό κύτταρο (signaling cell) και συνδέεται στους μεμβρανικούς υποδοχείς των γειτονικών ίδιου τύπου κυττάρων (target cells), αλλά και στο ίδιο το σηματοδοτικό κύτταρο. Αν ένα αυτοκρινές σήμα εκκρίνεται ταυτόχρονα από πολλά κύτταρα, η βιολογική απόκριση είναι πολύ ισχυρή. Αυτός ο τύπος σηματοδότησης είναι κοινός στην ανοσολογική απόκριση (**Εικόνα 1.5Γ**).
- 4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΕΠΑΦΗΣ (JUXTACRINE, CONTACT-DEPENDENT SIGNALING):** Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή επικοινωνούν μεταξύ τους με δύο τρόπους, είτε μέσω σύνδεσης των πρωτεϊνών της

Εικόνα 1.5

Ενδοκρινής, παρακρινής και αυτοκρινής σηματοδότηση.

Α. Ενδοκρινής μετάδοση του σήματος: η ορμόνη παράγεται από ενδοκρινή κύτταρα και μεταφέρεται μέσω του αίματος στα κύτταρα στόχους. **Β.** Κατά την παρακρινή σηματοδότηση ο τοπικός διαμεσολαβητής που εκκρίνει το σηματοδοτικό κύτταρο ενεργοποιεί γειτονικά κύτταρα στόχους. **Β1.** Είδος παρακρινούς επικοινωνίας είναι η συναπτική νευρωνική διαβίβαση. **Γ.** Κατά την αυτοκρινή σηματοδότηση το σήμα που απελευθερώνει το σηματοδοτικό κύτταρο ενεργοποιεί ίδιου τύπου γειτονικά κύτταρα στόχους, αλλά και το ίδιο. [1]



**Εικόνα 1.6****Σηματοδότηση μέσω επαφής.**

Τα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή, επικοινωνούν μεταξύ τους με δύο τρόπους:

A. Μέσω χασμοσυνδέσμων και B. Μέσω της σύνδεσης πρωτεϊνών της πλασματικής τους μεμβράνης.

πλασματικής τους μεμβράνης είτε μέσω χασμοσυνδέσμων (Εικόνα 1.6).

α. Αλληλεπίδραση μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών: Σε παρακείμενα κύτταρα η σύνδεση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης με ρόλο προσδέτη, του ενός κυττάρου, σε μια εξειδικευμένη συμπληρωματική μεμβρανική πρωτεΐνη με ρόλο υποδοχέα, του άλλου κυττάρου στόχου, έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη μιας ενδοκυτταρικής αλληλουχίας βιοχημικών αντιδράσεων στο κύτταρο στόχο. Αυτού του τύπου η επικοινωνία παίζει κύριο ρόλο στον ακριβή έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

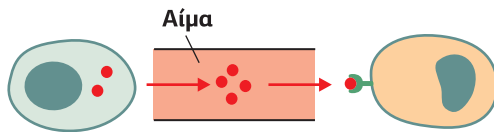
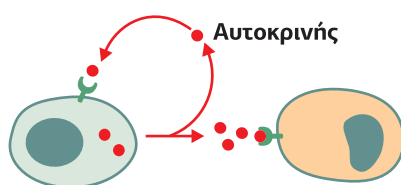
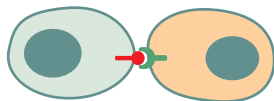
β. Μέσω χασμοσυνδέσμων: Οι χασμοσυνδέσμοι (gap junctions) είναι διακυτταρικά κανάλια μεταξύ παρακείμενων κυττάρων που επιτρέπουν τη μεταφορά ιόντων, μεταβολιτών και δευτέρων διαβιβαστών <1kDa. Η επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων συγχρονίζει τις δραστηριότητες κυτταρικών ομάδων, εξασφαλίζοντας μέγιστη ταχύτητα και συντονισμένη ενεργοποίηση.

Ιδιωτικό ή δημόσιο χαρακτήρα μπορεί να έχει και η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών (Εικόνα 1.7). Στοχοθετημένες αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας που διατηρούν την ιδιωτικότητα οφείλονται στις περιοχές αλληλεπίδρασης που έχουν οι πρωτεΐνες, ενώ για τις, ευρείας διάδοσης, επιδράσεις μεγάλου βεληνεκούς μια ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη παράγει μια μεγάλη ποσότητα σηματοδοτικών μορίων (δευτέρων διαβιβαστών), που διαθέτουν την ικανότητα να διαχέονται και να αλληλεπιδρούν, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά, με έναν μεγάλο αριθμό απομακρυσμένων πρωτεϊνών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επίδρασης μεγάλης εμβέλειας αποτελούν οι δεύτεροι διαβιβαστές, όπως το cAMP ή τα ιόντα Ca^{2+} , τα οποία παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και μπορούν να διαχέονται σε όλο το κυτταρόπλασμα αμέσως μετά τη διέγερση λίγων διαμεμβρανικών υποδοχέων.

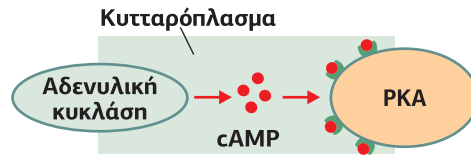
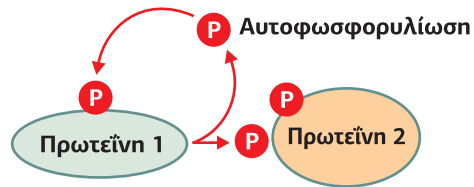
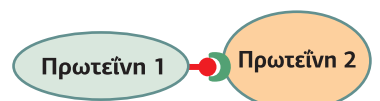
Ανάλογα με το πλαίσιο η σηματοδότηση μέσω δευτέρων διαβιβαστών μπορεί και αυτή να έχει έναν πιο ιδιωτικό χαρακτήρα. Για παράδειγμα, οι αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας σε υποκυτταρικά δίκτυα διευκολύνονται από μηχανισμούς εξάλειψης του σήματος, που περιορίζουν το σήμα σε έναν πολύ περιορισμένο υποκυτταρικό χώρο. Επιπλέον, ορισμένες εξειδικευμένες πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν ως προσαρμογείς ή πρωτεΐνες σκαλωσιάς, μπορούν να φέρουν σε επαφή πρωτεΐνες ώστε να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους ή να αγκυροβολήσουν πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της βιολογικής σηματοδότησης είναι η **παροδικότητα**. Τα σήματα πρέπει να έχουν μικρή διάρκεια ζωής, προκειμένου να αποφευχθεί η καταπόνηση του συστήματος. Γι' αυτό τα ερεθίσματα μεγάλης διάρκειας πρέπει να είναι περιοδικά κυμαινόμενα και, ταυτόχρονα, να μπορεί να ρυθμίζεται η συχνότητά τους. Αυτό είναι ένα τυπικό χαρακτηριστικό της νευρικής σηματοδότησης, αλλά και της ενδοκυτταρικής επεξεργασίας σήματος από δίκτυα πρωτεϊνών. Την παροδικότητα απελευθέρωσης του σήματος εγγυάται μια μεγάλη ποικιλία από ανασταλτικούς μηχανισμούς (κλείσιμο τασεο-εξαρτώμενων καναλιών Ca^{2+} , ενεργοποίηση προσυναπτικών υποδοχέων). Επιπλέον, πρωτεΐνες που παράγουν σήμα και πρωτεΐνες που εξαλείφουν σήμα συνδυάζονται συχνά σε σύμπλοκα, τα οποία πληρούν τις προϋποθέσεις των μοριακών ταλαντωτών. Συνεπώς, ένα περιοδικό πρότυπο και η ρύθμιση της συχνότητας παραγωγής/απελευθέρωσης των ενδοκυτταρίων σημάτων είναι ο κανόνας και όχι η εξαίρεση.

ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

ΕνδοκρινήςΠαρακρινήςΜέσω επαφής

ΔΙΑΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

2ος Διαβιβαστής - Μη ομοιοπολική αλληλεπίδρασηΦωσφορύλωση - Ομοιοπολική αλληλεπίδρασηΆμεση επαφή

Εικόνα 1.7

Διαφορετικοί τύποι διακυτταρικής και διαμοριακής σηματοδότησης. Η διακυτταρική σηματοδότηση είναι ενδοκρινής όταν το σηματοδοτικό μόριο μεταφέρεται με την κυκλοφορία του αίματος, παρακρινής όταν το σήμα διαχέεται μεταξύ γειτονικών κυττάρων και αυτοκρινής όταν το σήμα δρα εκ νέου στο σηματοδοτικό κύτταρο που το έχει απελευθερώσει. Στη σηματοδότηση μέσω άμεσης επαφής των κυττάρων, συμμετέχουν διαμεμβρανικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες.

Η διαμοριακή σηματοδότηση έχει δημόσιο χαρακτήρα, όταν τα σηματοδοτικά μόρια, τα οποία παράγονται από ενζυμικά ενεργές πρωτεΐνες, διαχέονται στο κυτταρόπλασμα και απευθύνονται σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών στόχων. Έχει ιδιωτικό χαρακτήρα, όταν απαιτείται η επαφή μεταξύ των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της φωσφορύλωσης μιας πρωτεΐνης από μια άλλη κίνηση ή της αυτοφωσφορύλωσης μιας κίνησης. Περισσότερο ιδιωτικού χαρακτήρα διαμοριακή σηματοδότηση απαιτεί την άμεση σύνδεση μεταξύ πρωτεϊνών που έχουν ειδικές θέσεις αλληλεπίδρασης. [13]

1.3

Διασταυρούμενη επικοινωνία και πολυπλοκότητα των σηματοδοτικών δικτύων

Η σηματοδοτική επικοινωνία δεν είναι γραμμική αλλά “διασταυρούμενη επικοινωνία”, καθώς το κάθε σήμα που λαμβάνεται από ένα κύτταρο δεν διεγείρει μια απλή γραμμική αλληλουχία λίγων βιοχημικών αντιδράσεων, αλλά ενεργοποιεί ένα μεγάλο τμήμα του πρωτεϊνικού δικτύου επεξεργασίας δεδομένων. Η κατάσταση μοιάζει πολύ με την επεξεργασία δεδομένων στον εγκέφαλο, όπου μία μόνο αισθητήρια εισερχόμενη πληροφορία επάγει ένα πρότυπο εκτεταμένης, διάχυτης ενεργοποίησης, και όχι τη διέγερση μιας μικρής μόνο ομάδας εξειδικευμένων νευρώνων.

Συγκρινόμενος με το μέγεθος ενός γονιδιώματος ο αριθμός των γονιδίων, που κωδικοποιούν σηματοδοτικές πρωτεΐνες, είναι μάλλον μέτριος. Έως σήμερα η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει δείξει ότι, από τα 30.000 γονίδια, τα 1.500 περίπου κωδικοποιούν υποδοχείς, 500 κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες, 150 κωδικοποιούν πρωτεϊνικές φωσφατάσες και 1.500 κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια περιέχουν αρκετά (έως 200) εξώνια, γεγονός που σημαίνει ότι το μεταγραφόμενο προ-mRNA υφίσταται, πιθανώς, εναλλακτικό μάτισμα. Κατά κανόνα, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από εναλλακτικά μετάγραφα, όπως αυτά που προκύπτουν από μάτισμα, εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες, δηλαδή διαφορετική συγγένεια προσδέτη, ενδοκυτταρική κατανομή ή ενζυμική δραστηριότητα. Υποθέτοντας αυθαίρετα ότι τουλάχιστον τρία διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα παράγονται ανά γονίδιο, φθάνει κανείς στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν 4.500 διαφορετικοί υποδοχείς, 1.500 πρωτεϊνικές κινάσες, 450 φωσφατάσες και τουλάχιστον 4.500 μεταγραφικοί παράγοντες.

Καθεμία από αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να υποστεί ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και έτσι οι ιδιότητές της να τροποποιηθούν περαιτέρω. Ας υποθέσουμε ότι τρεις διαφορετικές τροποποιήσεις ανά πρωτεΐνη εμφανίζονται κατά μέσο όρο, οι τροποποιήσεις αυτές παράγουν $2^3 = 8$ διαφορετικές διαμορφώσεις ON-OFF. Ο υπολογισμός αυτός αυξάνει τον αριθμό των εναλλακτικών μορφών των υποδοχέων σε 36.000, των κινάσων σε 12.000, των φωσφατάσων σε 3.600 και των μεταγραφικών παραγόντων σε 36.000, με αποτέλεσμα να υπερτερούν κατά

πολύ του συνολικού αριθμού των γονιδίων. Ο βαθμός της πολυπλοκότητας αυξάνεται δραματικά, καθώς γίνεται κατανοητό ότι οι περισσότερες σηματοδοτικές πρωτεΐνες υφίστανται ως ομο- και ετερο-ολιγομερή και όχι ως μονομερή και ότι ο αριθμός των λειτουργικών καταστάσεων του δικτύου αυξάνεται εκθετικά σύμφωνα με τον αριθμό των συστατικών στοιχείων. Πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι σε ένα δεδομένο κύτταρο ιστού μόνο ένα ποσοστό αυτών των παραλλαγών υλοποιείται.

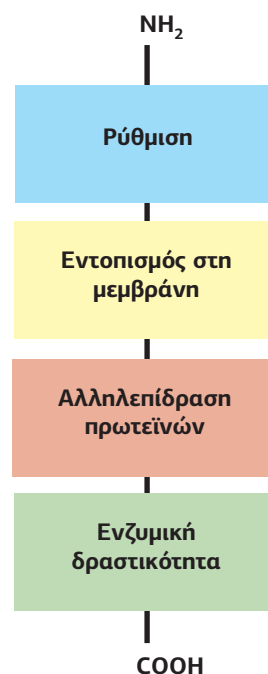
2. Περιοχές αλληλεπίδρασης: πώς συγκροτείται το σηματοδοτικό δίκτυο

Οι πρωτεΐνες δημιουργούν υψηλού βαθμού οργάνωσης σηματοδοτικά σύμπλοκα και δίκτυα επεξεργασίας δεδομένων. Τα δίκτυα αυτά προκύπτουν ανάλογα με τις ανάγκες, με έναν πλήρως αναστρέψιμο τρόπο. Πώς επιτυγχάνεται αυτό; Η αρχική έννοια που αποδόθηκε στις πρωτεΐνες, ως ελεύθερα διαχεόμενα μόρια που συναντούν το ένα το άλλο περισσότερο ή λιγότερο τυχαία, σήμερα θεωρείται παρωχημένη: Πρώτον, λόγω της εξαιρετικά υψηλής συγκέντρωσης μακρομορίων το εσωτερικό του κυττάρου μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ημιστερεό μέσο, στο οποίο η ελεύθερη διάχυση γίνεται με υπερβολικά μικρή ταχύτητα για τις διαδικασίες της ζωής και, δεύτερον, γιατί δεν θα ήταν δυνατή ούτε μια ρύθμιση ακριβείας ούτε μια ελεγχόμενη αλληλεπίδραση των συστατικών στοιχείων. Ωστόσο, και οι δύο είναι επιβεβλημένες για την κυτταρική επεξεργασία των δεδομένων. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών πρέπει να προκύπτουν από ειδικότερες και περισσότερο στοχευμένες διαδικασίες.

2.1 | Πρωτεϊνικές περιοχές αλληλεπίδρασης

Ο σχηματισμός συμπλόκων αποτελεί άμεση συνέπεια της δομής των πρωτεϊνών, η οποία περιέχει αυτοτελή δομικά στοιχεία-περιοχές αλληλεπίδρασης (modules). Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από καθορισμένες ακολουθίες αμινοξέων ή δομικά στοιχεία σύμφωνα με ένα σύστημα κατασκευής βάσει μονάδων. Σε γενικές γραμμές μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ **λειτουργικών στοιχείων** και **στοιχείων αλληλεπίδρασης**. Ένα λειτουργικό στοιχείο είναι, για παράδειγμα, η καταλυτική περιοχή ενός ενζύμου, ενώ ένα στοιχείο αλληλεπίδρασης είναι μια θέση επαφής για αλλοστερικούς ρυθμιστές (π.χ. πρωτεΐνες με το συμπληρωματικό στοιχείο αλληλεπίδρασης, διαχεόμενα σηματοδοτικά μόρια όπως είναι οι δεύτεροι διαβιβαστές, περιβαλλοντικοί παράγοντες) ή για κυτταρικές δομές (πλασματική μεμβράνη). Τα στοιχεία-περιοχές αλληλεπίδρασης εγγυώνται τη σχετικά σταθερή, αν και ως επί το πλείστον μη ομοιοπολική, σύνδεση μεταξύ των “συνεργατών”.

Στις σηματοδοτικές πρωτεΐνες τα στοιχεία αλληλεπίδρασης είναι ταυτόσημα με τις ρυθμιστικές περιοχές που χρησιμεύουν ως δέκτες των σημάτων εισόδου, ενώ τα λειτουργικά στοιχεία είναι οι καταλυτικές περιοχές που παράγουν σήματα εξόδου. Κατά κανόνα, οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες έχουν πολύ περισσότερα στοιχεία αλληλεπίδρασης σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες, όπως τα ένζυμα του μεταβολισμού. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τα πρωτεϊνικά δομικά στοιχεία ανασυνδυάστηκαν σε νέα πρότυπα μέσω γενετικών αναδιατάξεων. Συνεπώς, οι νέες μορφές στη μεταγωγή σήματος (που οδηγούν σε καινούριες ιδιότητες του οργανισμού) προκαλούνται από μοναδικούς συνδυασμούς των υπαρχόντων δομικών στοιχείων και όχι από την εφεύρεση εντελώς νέων πρωτεϊνικών δομών. Αυτός ο μηχανισμός εξέλιξης αποτελεί κύρια κινητήρια δύναμη της πολυπλοκότητας της σηματοδότησης. Μέσω αυτής της συνδυαστικής στρατηγικής τα κύτταρα εδραιώνουν τον αστρονομικά μεγάλο αριθμό των επαφών με πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας σχετικά λίγες περιοχές αλληλεπίδρασης.



Κατασκευή μιας πρωτεΐνης βάσει δομικών, λειτουργικών, ρυθμιστικών μονάδων καθώς και μονάδων αλληλεπίδρασης.

Πίνακας 1.2

Πρωτεϊνικές περιοχές αλληλεπίδρασης, οι οποίες ταξινομούνται σύμφωνα με τις θέσεις αναγνώρισης των συνεργατών τους

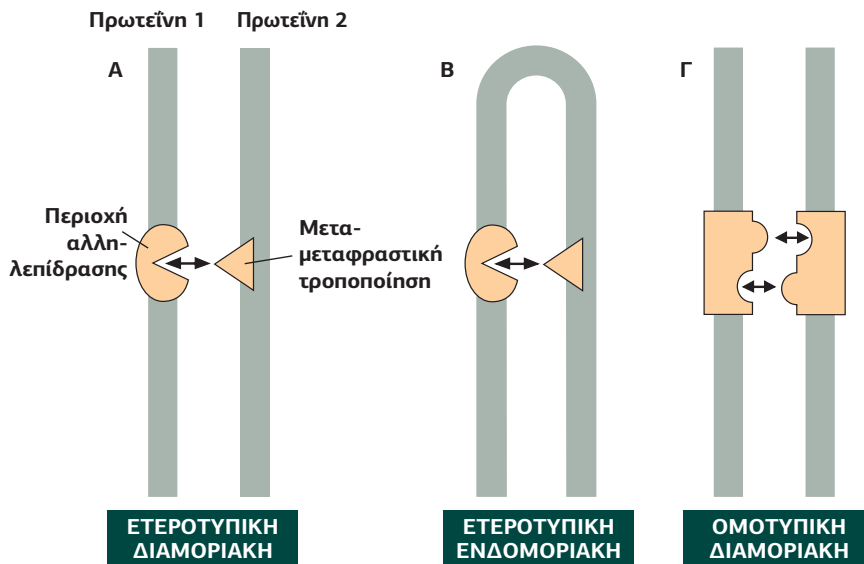
Στοιχείο-περιοχή αλληλεπίδρασης	Περιοχή αναγνώρισης στον “συνεργάτη”
1η Ομάδα: η περιοχή αλληλεπίδρασης αναγνωρίζει μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων	
SH3	Pro-x-x-Pro
SH3	Arg-x-x-Lys
WW	Pro-Pro-x-Tyr
PDZ	x-y-z-Val-COOH ή Leu-COOH
2η Ομάδα: η περιοχή αλληλεπίδρασης αναγνωρίζει μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων, η οποία περιέχει μια ομοιοπολική τροποποίηση	
SH2, PTB	φωσφο-Tyr
14-3-3, WW κ.λπ.	φωσφο-Ser
FHA, WD40	φωσφο-Thr
bromo	ακετυλο-Lys
chromo	μεθυλο-Lys
UIM, UBA, CUE, UEV, PAZ κ.λπ.	ουβικουιτινωμένη-Lys, πολυουβικουιτινωμένη-Lys
3η Ομάδα: η περιοχή αλληλεπίδρασης αναγνωρίζει λιπιδικά συστατικά της μεμβράνης	
C1	διακυλογλυκερόλη
C2	φωσφατιδυλοσερίνη
C2	φωσφατιδικό οξύ
PH	φωσφοϊνοσιτίδια
FYVE	3΄ φωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσιτίδια PI(3)P
PX	3΄ φωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσιτίδια PI(3)P, PI(3,4)P ₂
4η Ομάδα: η περιοχή αλληλεπίδρασης είναι όμοια με την περιοχή αναγνώρισης (ομοτυπική αλληλεπίδραση)	
Death Domain (DD)	DD
Death Effector Domain (DED)	DED
Caspase Activation and Recruitment Domain (CARD)	CARD
PDZ	PDZ
Sterile Alpha Motif (SAM)	SAM

Στον **Πίνακα 1.2** συνοψίζονται επιλεγμένες περιοχές αλληλεπίδρασης και ταξινομούνται σύμφωνα με τις θέσεις αναγνώρισης των συνεργατών τους. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει περιοχές που αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες αμινοξέων. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει περιοχές που αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες αμινοξέων, οι οποίες περιέχουν μια ομοιοπολική μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία οφείλεται, για παράδειγμα, σε φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση ή ουβικουιτίωση. Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει περιοχές που αλληλεπιδρούν με λιπιδικά συστατικά της μεμβράνης. Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει περιοχές που αλληλεπιδρούν με ταυτόσημες περιοχές άλλων πρωτεϊνών. Όταν, για παράδειγμα, δύο πρωτεΐνες περιέχουν PDZ περιοχές [ακρωνύμιο που προέρχεται από το πρώτο γράμμα των τριών πρωτεϊνών στις οποίες πρωτοανακαλύφθηκε, Post Synaptic

Density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), και Zonula Occludens-1 protein (ZO-1)] μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους (ομοτυπική διαμοριακή αλληλεπίδραση).

Οι περιοχές που αλληλεπιδρούν με αμινοξέα, τα οποία έχουν υποστεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση (**Εικόνα 1.8Α και Β**), αναγνωρίζουν το τροποποιημένο αμινοξύ μαζί με μια σχετικά μικρή αλληλουχία γειτονικών αμινοξέων. Τα γειτονικά αμινοξέα διαφέρουν από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη προσδίδοντας στις αλληλεπιδράσεις πρόσθετη εξειδίκευση, από τη στιγμή μάλιστα που οι συγγενείς περιοχές αλληλεπίδρασης είναι επίσης μεταβλητές. Έτσι, μια πρωτεΐνη με μια συγκεκριμένη περιοχή αναγνώρισης δεν αλληλεπιδρά απλώς με οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη που διαθέτει το τροποποιημένο αμινοξύ αλληλεπίδρασης, αλλά επιλέγει αυστηρά τον συνεργάτη της.

Η επιλεκτικότητα των αλληλεπιδράσεων είναι χαρακτηριστική στους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης. Αμέσως μετά τη σύνδεση του προσδέτη οι διμερείς διαμεμβρανικοί υποδοχείς-κινάσες υφίστανται trans-αυτοφωσφορυλίωση αρκετών καταλοίπων Tyr στην κυτταροπλασματική περιοχή τους, δημιουργώντας έτσι θέσεις επαφής για πρωτεΐνες με περιοχές SH2 και PTB (βλ. **Πίνακα 1.2**). Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες που θα αλληλεπιδράσουν με τους φωσφορυλιωμένους υποδοχείς διαθέτουν **εξειδικευμένες** περιοχές SH2 ή PTB, που αναγνωρίζουν μόνο ένα από τα ποικίλα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr του υποδοχέα. Με άλλα λόγια, κάθε αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη βρίσκει τη σωστή της θέση στον πρωτεϊνικό υποδοχέα. Αντιστρόφως, η ίδια θέση αναγνώρισης ενδέχεται να αλληλεπιδρά με αρκετές διαφορετικές περιοχές αλληλεπίδρασης. Για παράδειγμα, οι SH2 περιοχές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κατάλοιπα φωσφο-Tyr, και ορισμένες φορές με SH3 περιοχές, οι PDZ περιοχές ενδέχεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (ομοτυπικά), καθώς και με COOH-τελικές αλληλουχίες αμινοξέων.



Στην **Εικόνα 1.8** γίνεται διάκριση μεταξύ περιοχών που αλληλεπιδρούν με μη ομόλογες περιοχές (ετεροτυπικά) ή με ομόλογες περιοχές (ομοτυπικά). Παραδείγματα περιοχών που αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με ομοτυπικό τρόπο είναι οι περιοχές θανάτου (Death Domains) DD και DED (**Πίνακας 1.2**, η 4η ομάδα). Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απόπτωση. Μια άλλη ομάδα περιοχών αλληλεπίδρασης αναγνωρίζει συστατικά της μεμβράνης, όπως είναι τα φωσφολιπίδια. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν την αναστρέψιμη σύνδεση των πρωτεϊνών σε μεμβράνες και τη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων επεξεργασίας σημάτων σε μικρή απόσταση από μεμβρανικούς υποδοχείς. Ορισμένα μεμβρανικά λιπίδια είναι, επιπλέον, σηματοδοτικά μόρια ή δεύτεροι διαβιβαστές, που ελέγχουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν.

Εικόνα 1.8

Πρωτεϊνικές περιοχές αλληλεπίδρασης, οι οποίες αποτελούν θέσεις δέσμευσης για πρωτεΐνες που έχουν μια ειδική περιοχή-στοιχείο αναγνώρισης. Α. Ετεροτυπική διαμοριακή αλληλεπίδραση, κατά την οποία η περιοχή αλληλεπίδρασης της μιας πρωτεΐνης αναγνωρίζει μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση μιας άλλης πρωτεΐνης. Β. Ετεροτυπική ενδομοριακή αλληλεπίδραση, κατά την οποία η περιοχή αλληλεπίδρασης της μιας πρωτεΐνης αναγνωρίζει μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που συμβαίνει μέσα στην ίδια πρωτεΐνη. Γ. Ομοτυπική διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πανομοιότυπων περιοχών αλληλεπίδρασης. [13]

2.2 | Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις

Εικόνα 1.9

Αλλαγή της διαμόρφωσης με άρση της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης.

Λόγω ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των περιοχών 1 και 2 η πρωτεΐνη βρίσκεται σε κλειστή/ανενεργή διαμόρφωση. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις τρόποι (που αντιπροσωπεύουν σήματα εισόδου), με τους οποίους η κλειστή διαμόρφωση μπορεί να μετατραπεί σε ανοιχτή, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να ενεργοποιηθεί:

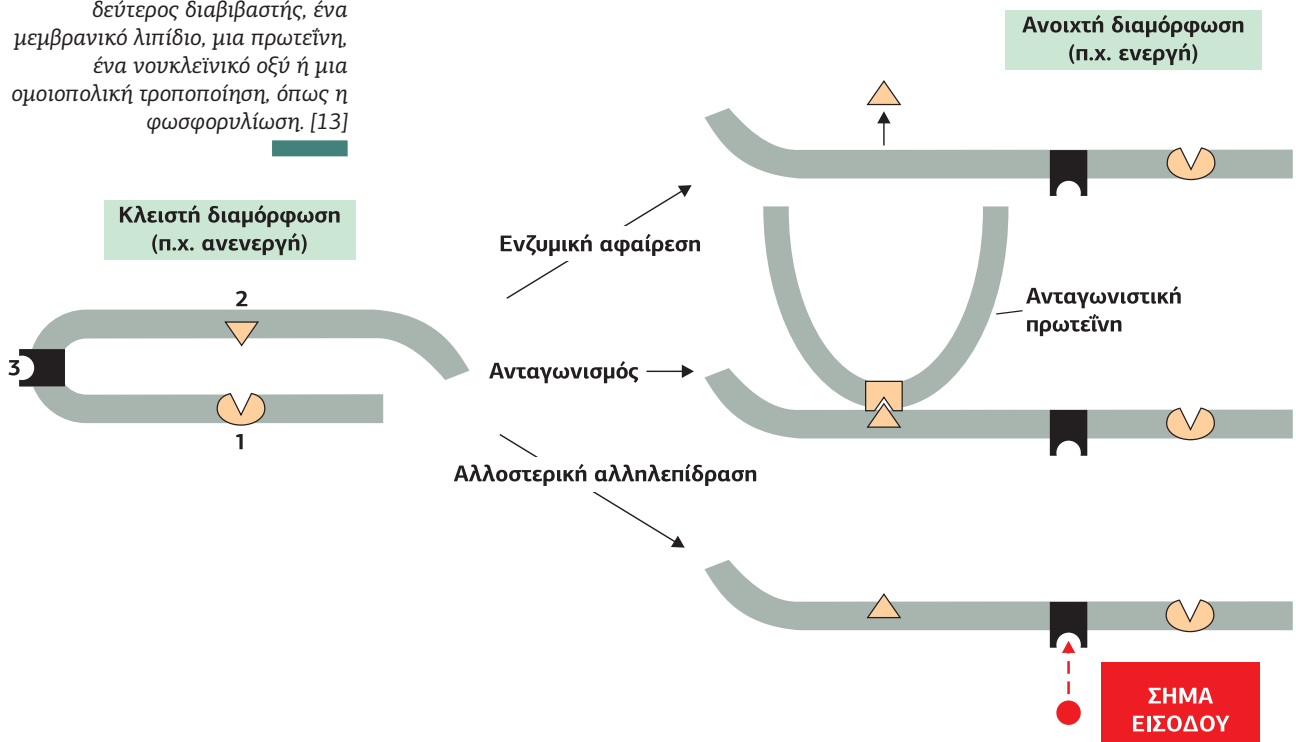
1. Η ενζυμική αφαίρεση μιας μετα-μεταφραστικής ομοιοπολικής τροποποίησης που έχει υποστεί ένα κρίσιμο αμινοξύ της περιοχής 2.
2. Η αλληλεπίδραση με μια ανταγωνιστική πρωτεΐνη που έχει μια θέση σύνδεσης για την περιοχή 2.
3. Η ομοιοπολική ή μη ομοιοπολική αλλοστερική αλληλεπίδραση ενός σηματοδοτικού μορίου με τη ρυθμιστική περιοχή 3. Το σήμα εισόδου ενδέχεται να είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους μόριο, όπως είναι ένας δεύτερος διαβιβαστής, ένα μεμβρανικό λιπίδιο, μια πρωτεΐνη, ένα νουκλεϊνικό οξύ ή μια ομοιοπολική τροποποίηση, όπως η φωσφορυλίωση. [13]

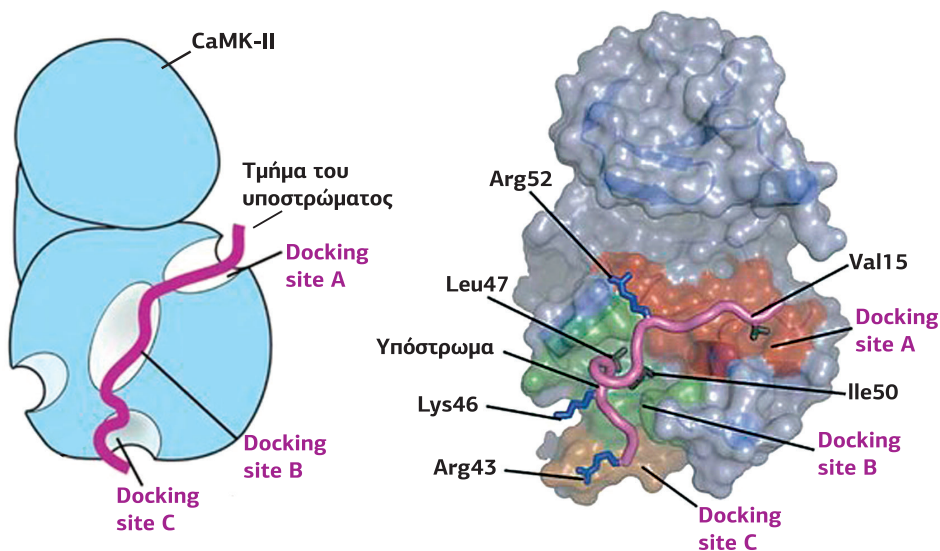
Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ρυθμιστικών περιοχών μπορεί να προκύψουν μέσα στο ίδιο το μόριο της πρωτεΐνης με ποικίλες συνέπειες για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η σύνδεση μιας περιοχής αλληλεπίδρασης στην περιοχή την οποία αναγνωρίζει μπορεί είτε να καταστείλει είτε να ενεργοποιήσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης, με τον ίδιο μηχανισμό που δρα ένας αλλοστερικός ανταγωνιστής ή αγωνιστής. Συχνά οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν μια συγκεκριμένη διαμόρφωση, με σκοπό να διατηρήσουν τη σηματοδοτική πρωτεΐνη σε ανενεργή ή σε ενεργή κατάσταση.

Η εσωτερική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης μπορεί να αρθεί από ένα σήμα εισόδου, στην περίπτωση που το σήμα είτε ανταγωνίζεται με την περιοχή αλληλεπίδρασης για τη σύνδεση στην περιοχή αναγνώρισης είτε αφαιρεί την ομάδα αναγνώρισης, π.χ. την φωσφορική ομάδα, εφόσον πρόκειται για μια ομοιοπολική τροποποίηση, είτε συνδέεται σε μια δεύτερη περιοχή αναγνώρισης επάγοντας μια αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης (**Εικόνα 1.9**). Είναι εμφανές ότι η άρση του ενδομοριακού αποκλεισμού μοιάζει με την αναστρέψιμη διαδικασία της λειτουργίας του διακόπτη.

2.3 | Περιοχές αγκυροβόλια (docking domains)

Σύμφωνα με βασική αρχή της Βιοχημείας, προκειμένου να αναγνωριστεί το υποστρώμα από το ένζυμο, πρέπει να δεσμευτεί στερεοειδικά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα μεταβολικά ένζυμα, οι περισσότερες πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος μπορούν να αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων. Αυτό ισχύει, για παράδειγμα, για την πλειονότητα των πρωτεϊνικών κινασών. Το ερώτημα που τίθεται είναι πώς κάθε κίνηση αναγνωρίζει επιλεκτικά τα δικά της υποστρώματα και όχι αυτά των στενά συνδεδεμένων κινασών, καθώς οι θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης και θρεονίνης στερούνται αυστηρής εξειδίκευσης. Οι κινάσες συχνά περιέχουν, επιπλέον, περιοχές αγκυροβόλια (docking domains), οι



**Εικόνα 1.10**

Περιοχές αγκυροβόλεια (docking domains) στην κινάση CaMK-II. Στην εικόνα φαίνονται οι τρεις περιοχές αγκυροβόλεια (Docking site A, B, C) της CaMK-II, οι οποίες συνδέονται σε ειδικές θέσεις της πρωτεΐνης-υποστρώματος, αυξάνοντας την εξειδίκευση και τη συγγένεια της κινάσης για τα υποστρώματά της. [2]

οποίες είναι ξεχωριστές και απομακρυσμένες από τη θέση του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου, και αναγνωρίζουν, με υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, αντίστοιχες περιοχές σύνδεσης στο υπόστρωμα (**Εικόνα 1.10**). Οι περιοχές αγκυροβόλεια όχι μόνο αυξάνουν την εξειδίκευση, αλλά επίσης βοηθούν το ένζυμο να βρει το υπόστρωμά του.

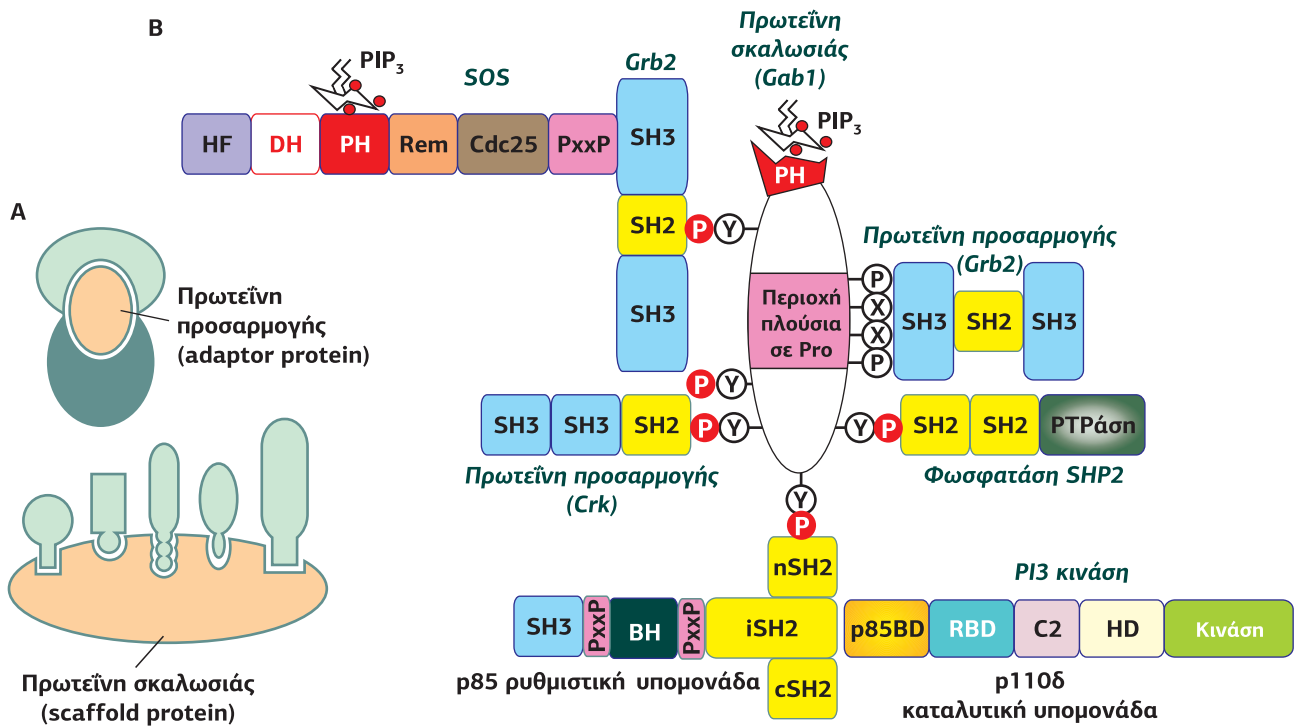
Όπως και άλλα μοτίβα αλληλεπίδρασης, ορισμένες περιοχές αγκυροβόλεια ενδέχεται να δημιουργούνται κατά περίπτωση έπειτα από ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συγκεκριμένων αμινοξέων. Ένας τέτοιος μηχανισμός καθιστά τη διαδικασία δημιουργίας συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος έναν ρυθμιζόμενο στόχο των εισερχόμενων σημάτων. Παραδείγματα αποτελούν η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινάσεων και των υποστρωμάτων των λιγασών ουβικουιτίνης μέσω της φωσφορυλίωσής τους.

2.4 | Πρωτεΐνες προσαρμογής και πρωτεΐνες σκαλωσιάς

Δεδομένου ότι η συναρμολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις απαιτεί πολλές διαφορετικές περιοχές αγκυροβόλεια σε κάθε πρωτεΐνη, το έργο της στοχοθέτησης και συναρμολόγησης ανατέθηκε σε ειδικές ξεχωριστές πρωτεΐνες σκαλωσιάς και πρωτεΐνες προσαρμογής, οι οποίες κυριαρχούν στην επεξεργασία σήματος, ιδίως σε ευκαρυώτες, και αυξάνουν δραματικά τον βαθμό ελευθερίας του συστήματος.

Οι **πρωτεΐνες προσαρμογής** (adaptor proteins) αποτελούνται κυρίως από περιοχές αλληλεπίδρασης και συχνά στερούνται λειτουργικών περιοχών. Ως “μοριακά δίηριζα” προσαρμόζονται σε άλλες πρωτεΐνες και διαμορφώνουν λειτουργικές μονάδες (**Εικόνα 1.11**). Με τη χρήση μιας μόνο πρωτεΐνης προσαρμογής ένα κύτταρο μπορεί να συνδέει διαφορετικούς τύπους υποδοχών με τον ίδιο ενδοκυτταρικό τελεστή.

Οι πρωτεΐνες προσαρμογής απέχουν μόνο ένα μικρό βήμα από τις **πρωτεΐνες σκαλωσιάς** (scaffold proteins), οι οποίες παίζουν τον ρόλο μιας πλατφόρμας, στην οποία προσκολλώνται άλλες πρωτεΐνες, επιτρέποντας έτσι αλληλεπιδράσεις υψηλού βαθμού εξειδίκευσης. Αυτοί οι πολυπροσαρμογείς μπορούν να συγκριθούν με τα πολύηριζα των ηλεκτρονικών συσκευών. Είναι εξαιρετικά σημαντικοί για την επεξεργασία σήματος, δεδομένου ότι καθιερώνουν νέες, αλλά αναστρέψιμες συνδέσεις μεταξύ σηματοδοτικών οδών, ενώ παράλληλα προσδίδουν σ’ αυτές τις οδούς μια χωρική και χρονική εξειδίκευση.



Εικόνα 1.11

Πρωτεΐνες προσαρμογής και πρωτεΐνες σκαλωσιάς. Α. Μέσω των περιοχών αλληλεπίδρασης που περιέχουν οι πρωτεΐνες προσαρμογής (adaptor proteins) και οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς (scaffold proteins) συνδέουν πρωτεΐνες, προκειμένου να σχηματίσουν λειτουργικές μονάδες και πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Β. Διακρίνεται ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που δημιουργείται από την πρωτεΐνη σκαλωσιάς Gab1 (Grb2-Associated-Binding protein 1), στην οποία συνδέεται η πρωτεΐνη προσαρμογής Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), τα PIP_3 , η PI3-κινάση (διακρίνονται η ρ85 ρυθμιστική και η ρ110δ καταλυτική υπομονάδα), η φωσφατάση τυροσίνης SHP2 και η πρωτεΐνη προσαρμογής Crk. Το σύμπλοκο επεκτείνεται καθώς στην Grb2 συνδέεται και ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων RasGEF, SOS.

2.5

Το αίνιγμα της πολυπλοκότητας

Η σύνθεση των πρωτεϊνών με βάση δομικές περιοχές αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό στοιχείο της βιολογικής εξέλιξης. Πολλές περιοχές αλληλεπίδρασης βρίσκονται ήδη σε προκαρυώτες, ενώ άλλες εμφανίστηκαν αργότερα, όπως, για παράδειγμα, οι SH2 εμφανίστηκαν ταυτόχρονα με την εμφάνιση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης σε πολυκύτταρους ζωικούς οργανισμούς. Στη μετα-γονιδιωμική εποχή αυτός ο εξελικτικός συντηρητισμός παρέχει τη βάση για την απογραφή των σηματοδοτικών πρωτεϊνών, καθώς με ηλεκτρονική ανάλυση, σε όλο το εύρος του γονιδιώματος, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών με συναφείς περιοχές και άρα συναφείς λειτουργίες (όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι G-πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες AAA+, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες).

Τέτοιου είδους μελέτες αποδεικνύουν ότι ο αριθμός των περιοχών αλληλεπίδρασης είναι σχετικά μικρός σε απλούς μονοκύτταρους και πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως ο ζυμομύκητας και ο νηματώδης *Caenorhabditis elegans*, και οριακά αυξημένος στον άνθρωπο. Ωστόσο, δραματικά διευρυμένος είναι ο αριθμός των συνδυασμών των περιοχών αλληλεπίδρασης σε ένα μόριο πρωτεΐνης, δηλαδή η πολυπλοκότητα της δομής των πρωτεϊνών από αυτοτελείς περιοχές αλληλεπίδρασης. Για παράδειγμα, αλληλουχίες που κωδικοποιούν την SH3 περιοχή έχουν βρεθεί σε 31 γονίδια στους ζυμομύκητες, 132 γονίδια σε νηματώδεις (*C. elegans*) και 273 γονίδια εντόμων (*Drosophila*), αλλά σε 894 γονίδια του ανθρώπου. Στην πραγματικότητα, η αρχή της (σχεδόν) ελεύθερης ανάμειξης των αυτοτελών μονάδων των πρωτεϊνών δίνει τη δυνατότητα στη βιολογική εξέλιξη να κατασκευάζει διαρκώς νέα κυκλώματα επεξεργασίας δεδομένων, με αποτέλεσμα την αύξηση της πολυπλοκότητας, αν και ο αριθμός των βασικών μονάδων παραμένει μάλλον περιορισμένος. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης μια περιοχή αλληλεπίδρασης ενδέχεται να διαχωριστεί σε μια ευρεία ποικιλία ισομορφών, που διαφέρουν ως προς τις ιδιότητές τους, όπως είναι η εξειδίκευση πρόσδεσης.

Αυτή η τάση για συνδυαστική εξέλιξη, η οποία γίνεται εμφανής και σε άλλες διαδικασίες, όπως το εναλλακτικό μάτισμα του pro-mRNA, ενδέχεται να εξηγήσει αυτό

που έχει χαρακτηριστεί ως το αίνιγμα της πολυπλοκότητας: γιατί το μέγεθος του ανθρώπινου γονιδιώματος (30.000 γονίδια) έχει περίπου το ίδιο μέγεθος με αυτό του ποντικού και διαφέρει, απροσδόκτα (για να μην πούμε απογοητευτικά), τόσο λίγο από εκείνο του μικροσκοπικού και φαινομενικά πρωτόγονου γαιοσκώληκα *C. elegans* (19.000 γονίδια), του μικρού εντόμου *Drosophila melanogaster* (14.000 γονίδια) ή ακόμα και ενός ζιζανίου, όπως το *Arabidopsis thaliana* (26.000 γονίδια).

Συνοψίζοντας, η κυτταρική επεξεργασία δεδομένων στηρίζεται στη δομή των πρωτεϊνών, η βάση της οποίας είναι αυτοτελείς μονάδες, που αποτελούνται από ειδικές ακολουθίες αμινοξέων, οι οποίες εκπληρώνουν τον ρόλο των λειτουργικών περιοχών ή περιοχών με ικανότητα αλληλεπίδρασης. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης αυτές οι αυτοτελείς μονάδες έχουν συνδυαστεί σε πρότυπα μιας διαρκώς αυξανόμενης πολυπλοκότητας. Οι πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος διαφέρουν από τα μεταβολικά ένζυμα και τις δομικές πρωτεΐνες, γιατί διαθέτουν έναν ιδιαίτερα μεγάλο αριθμό περιοχών αλληλεπίδρασης που λαμβάνουν σήματα εισόδου ή επιτρέπουν άλλα είδη ειδικών αλληλεπιδράσεων (όπως η στόχευση υποστρωμάτων σε υποκυτταρικές περιοχές και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις). Οι περιοχές αλληλεπίδρασης είτε αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της πρωτεϊνικής δομής είτε σχηματίζονται κατ' απαίτηση με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες προσαρμογής και οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς είναι εξειδικευμένες στη συναρμολόγηση πρωτεϊνών και άλλων παραγόντων σε σύμπλοκα μεταγωγής σήματος.

3. Εφοδιασμός του δικτύου με ενέργεια: Βασική βιοχημεία της μεταγωγής σήματος

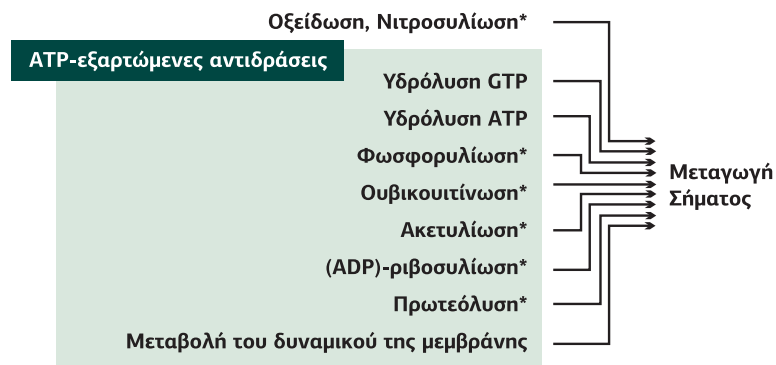
Η κυτταρική μεταγωγή σήματος βασίζεται πρώτα από όλα σε βιοχημικές αντιδράσεις, που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις του πρωτεϊνικού δικτύου, ενώ ταυτόχρονα παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια για την επεξεργασία των δεδομένων. Θα περιγράψουμε τις πιο συνηθισμένες και σημαντικές αντιδράσεις διακόπτες, παρέχοντας στον αναγνώστη έναν “μίτο της Αριάδνης”, που θα τον βοηθήσει να βρει ένα μονοπάτι μέσα στον λαβύρινθο των λεπτομερειών που θα συζητηθούν στη συνέχεια του βιβλίου.

Τα συστήματα επεξεργασίας δεδομένων βασίζονται στην παροχή ενέργειας, όπως ένας Η/Υ απαιτεί διαρκή τροφοδότηση με ηλεκτρισμό και ένας εγκέφαλος μεταβολική ενέργεια. Η μεταγωγή σήματος αντικατοπτρίζει τη θεμελιώδη αρχή της ζωής: κάθε διεργασία αυτο-οργάνωσης (δημιουργίας τάξης) πρέπει πάντα να συνδυάζεται με μια άλλη διεργασία που παρέχει ενέργεια δημιουργώντας αποδιοργάνωση ή χάος (δεύτερος νόμος της θερμοδυναμικής). Αλλά τι ακριβώς συμβαίνει σε μοριακό επίπεδο;

Μια πρωτεΐνη παρομοιάζεται με έναν διακόπτη ON-OFF, που μπορεί να ενεργοποιηθεί και να απενεργοποιηθεί. Μια τέτοια διεργασία διακόπτης μπορεί να παρομοιαστεί με μια χημική αντίδραση που δεν βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας. Αυτό σημαίνει πως όταν η μετατοπισμένη προς τα δεξιά αντίδραση είναι εξεργονική (απελευθερώνει ενέργεια και άρα πραγματοποιείται αυθόρμητα), η αντίστροφη αντίδραση (προς τα αριστερά) πρέπει απαραίτητα να είναι ενδεργονική (απαιτεί παροχή ενέργειας) ή το αντίθετο. Επομένως, μια πρωτεΐνη διακόπτης πρέπει να συνδέεται με μια αντίδραση που παράγει ενέργεια, επειδή διαφορετικά θα έπαιρνε μόνο την “ενεργή” ή την “ανενεργή” μορφή. Συνεπώς, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως όλες οι κυτταρικές διαδικασίες που λειτουργούν ως διακόπτες συνδέονται με βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες παρέχουν τεράστια ποσότητα ενέργειας. Συγκεκριμένα, αυτές είναι οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, η υδρόλυση των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (NTPs) και άλλων ενεργειακά πλούσιων συστατικών, η αποικοδόμηση των μακρομορίων και η ροή ιόντων διαμέσου καναλιών της κυτταρικής μεμβράνης, σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους βαθμίδωση (**Εικόνα 1.12**).

Εικόνα 1.12

Οι συχνότερες αντιδράσεις-διακόπτες στην κυτταρική επεξεργασία σήματος. Οι αντιδράσεις, που συνοψίζονται εδώ, οδηγούν σε μη ομοιοπολικές αλλαγές ή ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (σημειώνονται με αστερίσκους) των πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος. Αυτές εξαρτώνται από ή συνδέονται με διαδικασίες παροχής ενέργειας, όπως η υδρόλυση του ATP (πλαίσιο) ή με αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. [13]



3.1

Μετα-μεταφραστικές ομοιοπολικές τροποποιήσεις

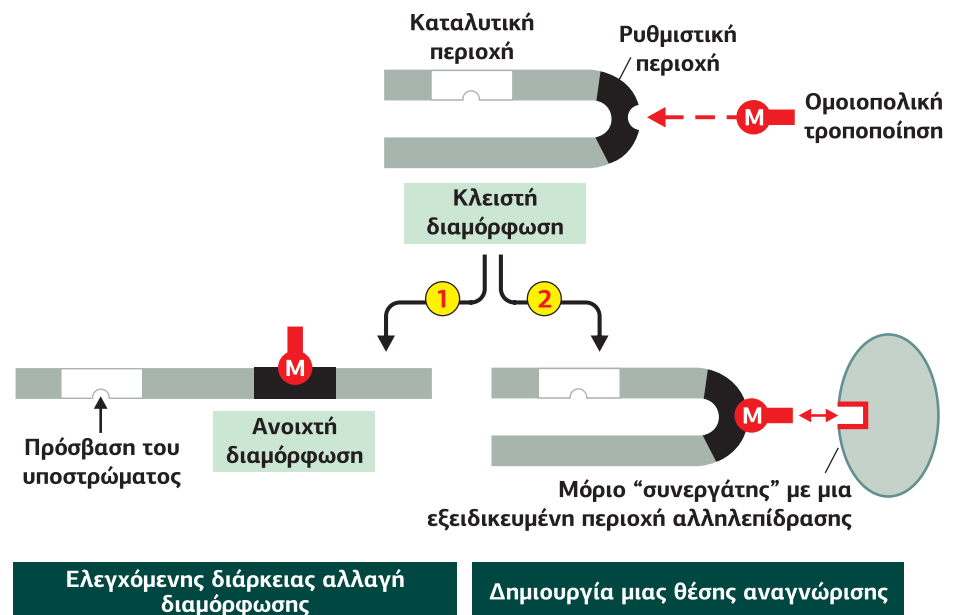
Συχνά οι βιοχημικές αντιδράσεις που παρέχουν ενέργεια και συνδέονται με τη μεταγωγή σήματος δημιουργούν ομοιοπολικές αλλαγές στις σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Τέτοιες αλλαγές ονομάζονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Είναι πλήρως αντιστρεπτές, με τις αντιδράσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις να καταλύονται από ένζυμα. Όπως συνοψίζεται στην **Εικόνα 1.12**, οι πιο συχνές αντιδράσεις είναι:

1. Οξειδώσεις και νιτροσυλίωσεις (σε Cys).
2. Φωσφορυλίωσεις (σε Ser/Thr, και Tyr), που καταλύονται από πρωτεϊνικές κινάσες.
3. Ουβικουιλίνωσεις (σε Lys), που καταλύονται από τρανσφεράσες της ουβικουιλίνης.
4. Ακετυλίωσεις (σε Lys), που καταλύονται από ακετυλοτρανσφεράσες.
5. ADP-ριβουσίωσεις (σε Arg), που καταλύονται από ADP-ριβουσοτρανσφεράσες.
6. Μερική πρωτεόλυση, που καταλύεται από πρωτεάσες.

Όσον αφορά τη μεταγωγή σήματος, οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών έχουν τουλάχιστον δύο πλεονεκτήματα όσον αφορά τη χρονική διάρκεια και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της σηματοδοτικής διαδικασίας (**Εικόνα 1.13**):

Εικόνα 1.13

Δύο συνέπειες των ομοιοπολικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η ομοιοπολική τροποποίηση (M) μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης (π.χ. ενζύμου) με τέτοιο τρόπο ώστε είτε να γίνει προσβάσιμη η καταλυτική περιοχή του ενζύμου, επιτρέποντας την προσέγγιση του υποστρώματος (μονοπάτι 1), είτε να δημιουργηθεί μια θέση αναγνώρισης από ένα μόριο με συμπληρωματική περιοχή αλληλεπίδρασης (μονοπάτι 2). Αυτός ο μηχανισμός παίζει έναν ρόλο κλειδί στον σχηματισμό των πρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων και στην υποκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών. Συχνά μία μόνο τροποποίηση έχει και τα δύο αποτελέσματα. Η εικόνα αυτή μπορεί να γενικευτεί: εκτός από την καταλυτική περιοχή ενός ενζύμου, κάθε περιοχή αναγνώρισης (για παράδειγμα μια θέση σύνδεσης για έναν αλλοστερικό τελεστή ή ένα συστατικό του κυτταροσκελετού) μπορεί είτε να εκτεθεί είτε να καλυφθεί από την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση, που προκαλείται από μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση. [13]



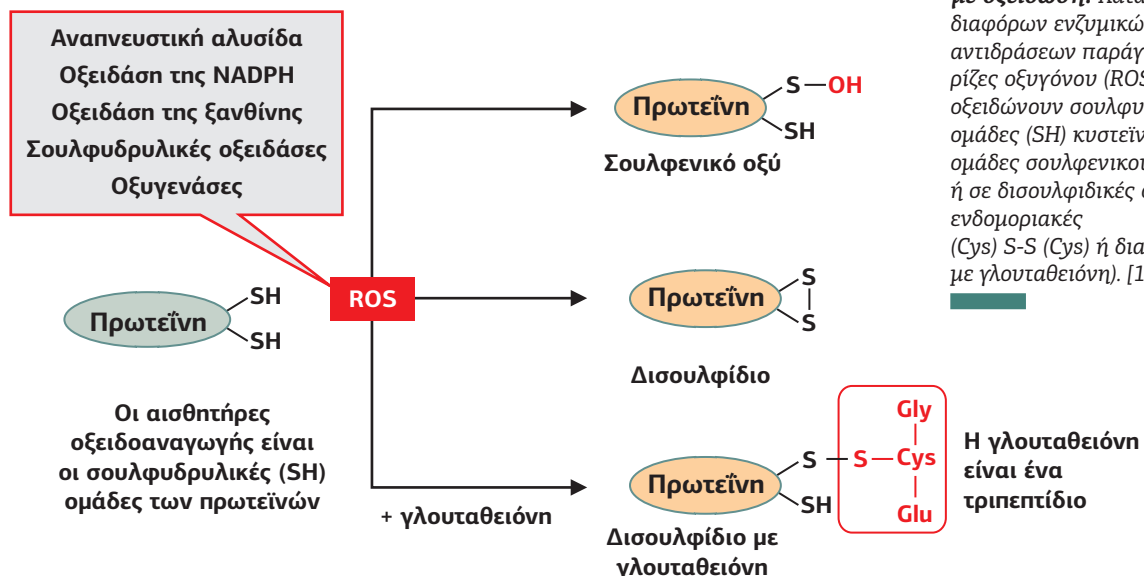
1. Η ομοιοπολική μετα-μεταφραστική τροποποίηση, σε σύγκριση με μια μη ομοιοπολική αλλαγή, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της χρονικής διάρκειας της διαδικασίας μεταγωγής σήματος, καθώς η δομική και λειτουργική αλλαγή που προκαλεί το σήμα εισόδου στην πρωτεΐνη διαρκεί μέχρις ότου η τροποποίηση να αντιστραφεί από τα αντίστοιχα ένζυμα (αναγωγάσες, φωσφατάσες φωσφοπρωτεϊνών, ουβικουιτινικές πρωτεάσες, αποακετυλάσες, ή ADP-ριβοσυλοϋδρολάσες), τα οποία ελέγχονται από σήματα εισόδου.
2. Η ομοιοπολική τροποποίηση δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης (π.χ. μια φωσφορυλιωμένη τυροσίνη), ικανή για μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν την αντίστοιχη θέση αλληλεπίδρασης (π.χ. την περιοχή SH2). Όταν η πρωτεΐνη αποκτήσει την κατάλληλη θέση αναγνώρισης, συνδέεται μη ομοιοπολικά με την αντίστοιχη περιοχή αλληλεπίδρασης, σαν μια κλειδαριά με το κλειδί της. Αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό και την ενδοκυτταρική στόχευση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, καθώς και δικτύων που επεξεργάζονται το σήμα. Με αυτόν τον τρόπο η ομοιοπολική τροποποίηση ελέγχει τη διαδικασία-διακόπτη χωροταξικά.

3.2

Αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και νιτροσυλίωσης ως διακόπτες: μια ισορροπία σε λεπτή γραμμή

Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, από τις αρχαιότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας των αερόβιων κυττάρων. Η οξειδοαναγωγή συμμετέχει στη σηματοδότηση με διαμεσολάβηση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), που παράγονται από διάφορα μεταβολικά μονοπάτια (ή μη ενζυμικά) κατά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε H_2O . Οι αισθητήρες οξειδοαναγωγής των πρωτεϊνών είναι οι σουλφυδρυλικές ομάδες (SH) των κυστεϊνών. Οι ROS, συγκεκριμένα το **υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2** , οξειδώνοντας τις σουλφυδρυλικές ομάδες τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τη δομή και τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης, καθώς μετατρέπουν τις σουλφυδρυλικές ομάδες (SH) σε ομάδες σουλφενικού οξέος (SOH) ή σε δισουλφιδικές ομάδες, δημιουργώντας ενδομοριακούς (Cys) S-S (Cys) ή διαμοριακούς δεσμούς θείου (**Εικόνα 1.14**).

Όπως αναμένεται για ένα γεγονός σηματοδότησης, η οξείδωση είναι ιδιαίτερα επιλεκτική. Στην πραγματικότητα, συνήθως μόνο ένα από τα πολλά κατάλοιπα κυστεϊνης μιας πρωτεΐνης προσβάλλεται από το οξειδωτικό μέσο.



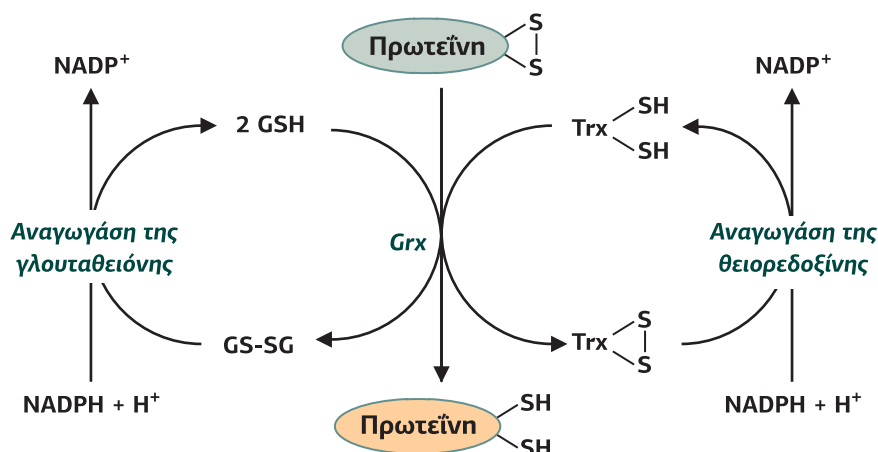
Εικόνα 1.14

Βιοχημεία της σηματοδότησης με οξείδωση. Κατά την πορεία διαφόρων ενζυμικών ή μη αντιδράσεων παράγονται ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), που οξειδώνουν σουλφυδρυλικές ομάδες (SH) κυστεϊνών σε ομάδες σουλφενικού οξέος (SOH) ή σε δισουλφιδικές ομάδες, ενδομοριακές (Cys) S-S (Cys) ή διαμοριακές (εδώ με γλουταθειόνη). [13]

Εικόνα 1.15

Βιοχημεία της σηματοδότησης με αναγωγή. Η πρωτεΐνη που έχει τροποποιηθεί από το οξειδωτικό σήμα (εδώ με μια ενδομοριακή δισουλφιδική γέφυρα -S-S-) ανάγεται:

α. Χρησιμοποιώντας ως δότη H^+ και e^- την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οξείδωση της οποίας καταλύεται από το ένζυμο γλουταρεδοξίνη (glutaredoxin, Grx) και οδηγεί στην παραγωγή ενός διμερούς δισουλφιδίου GS-GS. Στη συνέχεια, η αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας ως δότη e^- το NADPH. β. Χρησιμοποιώντας ως δότη H^+ και e^- μια μικρή πρωτεΐνη 12 kDa, τη θειορεδοξίνη (thioredoxin, Trx), η οποία καταλύει την αυτο-οξείδωσή της σε ενδομοριακό δισουλφίδιο. Στη συνέχεια, αυτό το δισουλφίδιο ανάγεται από την αναγωγή της θειορεδοξίνης, με το NADPH να δρα ως δότης e^- . [13]



Η διαδικασία της οξείδωσης αντιστρέφεται με δύο ειδών αναγωγάσες: α. τις **γλουταρεδουκτάσες**, οι οποίες χρησιμοποιούν ως συμπράγοντα και δότη H^+ και e^- την ανηγμένη γλουταθειόνη, και β. τις **θειορεδουκτάσες** πρωτεΐνες 12 kDa που καταλύουν την αυτο-οξείδωσή τους σε ενδομοριακά δισουλφίδια δρώντας ταυτόχρονα ως δότες H^+ και e^- (**Εικόνα 1.15**). Η σηματοδότηση με αναγωγή απαντάται τόσο στους προκαρυώτες όσο και στους ευκαρυώτες και είναι πιο διαδεδομένη από ό,τι θεωρούσαμε έως σήμερα.

Οι πρωτεΐνες που τροποποιούνται από αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής αλλάζουν διαμόρφωση και μεταπίπτουν από μια κατάσταση ON σε μια κατάσταση OFF (**Εικόνα 1.16**).

Μια χαρακτηριστική τροποποίηση με οξείδωση είναι η **νιτροσουλίωση** των ομάδων SH των κυστεϊνών στις πρωτεΐνες. Σε αυτήν την περίπτωση το οξείδιο του αζώτου (NO), που παράγεται από την ενζυμική οξείδωση της αργινίνης, είναι το δραστικό ενδιάμεσο. Το NO είναι τόσο εξωκυτταρικό όσο και ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μόριο. Ενδοκυτταρικά το NO έχει διπλή δράση, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική γουανυλική κυκλάση, στην οποία συνδέεται μη ομοιοπολικά, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις τροποποιεί άλλες πρωτεΐνες με ομοιοπολική νιτροσουλίωση, σχηματίζοντας (Cys)-S-NO ομάδες. Όταν το **NO υπερπαράγεται παθολογικά**, η νιτροσουλίωση πραγματοποιείται μη ειδικά. Γι' αυτόν τον λόγο το κυτταρικό στρες που οφείλεται στο NO (υπερπαραγωγή RNS, Reactive Nitrogen Species) είναι εξίσου επιβλαβές για τα κύτταρα όσο και το οξειδωτικό στρες (υπερπαραγωγή ROS, Reactive Oxygen Species) (**Εικόνα 1.17**).

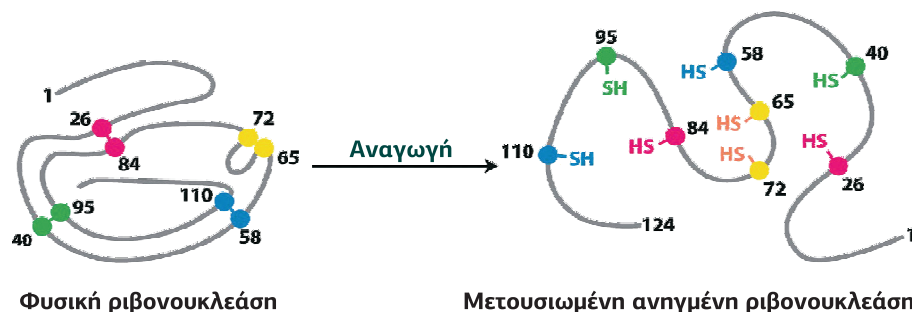
Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ωστόσο, η παραγωγή NO είναι αυστηρά ελεγχόμενη και η νιτροσουλίωση χρησιμοποιείται αποκλειστικά για σηματοδοτικά ρυθμιζόμενη μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών. Σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 100 πρωτεΐνες, των οποίων οι λειτουργίες ρυθμίζονται επιλεκτικά από το NO, όπως η GTPάση Ras, οι υποδοχείς ρυανοδίνης (βλ. **Εικόνα 4.81**), τα L-τύπου κανάλια Ca^{2+} , οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού κ.λπ.. Αν και η **νιτροσουλίωση** είναι κατά κανόνα μια μη ενζυμική αντίδραση, προσβάλλει μόνο επιλεγμένα κατάλοιπα κυστεϊνης. Η αιτία είναι η χωροταξική προσβασιμότητα μιας

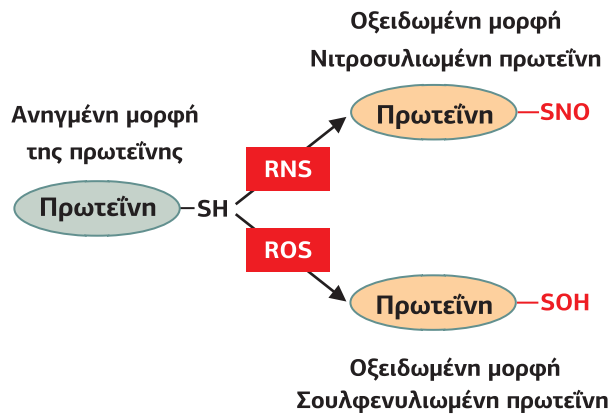
Η γλουταθειόνη ένα

τριπεπτίδιο Glu-Cys-Gly, το οποίο βρίσκεται στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις mM. Είναι ανθεκτικό στις ROS, αλλά οξειδώνεται σε ένα διμερές δισουλφίδιο δρώντας ως δότης H^+ και e^- σε πρωτεΐνες με δισουλφιδικές ομάδες.

Εικόνα 1.16

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας πρωτεΐνης (ριβονουκλεάση), η οποία όταν υφίσταται αναγωγή χάνει τη φυσική της διαμόρφωση, που διατηρείται χάρη στους δεσμούς θείου ανάμεσα σε συγκεκριμένες Cys (π.χ. 26-84, 65-72, 58-110 και 40-95) και απενεργοποιείται.

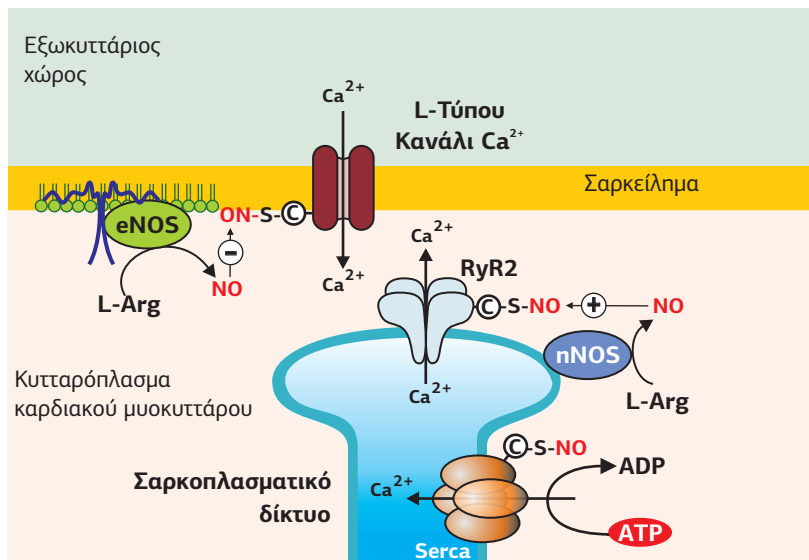


**Εικόνα 1.17**

Μια πρωτεΐνη, η οποία περιέχει κατάλοιπα κυστεΐνης, μπορεί να οξειδωθεί είτε λόγω παραγωγής ROS (Reactive Oxygen Species) είτε λόγω παραγωγής RNS (Reactive Nitrogen Species). Με την αντίδραση νιτροσουλώσεως, κατά κανόνα χωρίς την απαίτηση ενζύμου, το NO μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά σε επιλεγμένα κατάλοιπα Cys μιας πρωτεΐνης, σχηματίζοντας (Cys)-S-NO ομάδες.

σουλφυδρυλικής ομάδας (SH) που επηρεάζεται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Μια επιπλέον αιτία της επιλεκτικότητας είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός των NO συνθασών (NOS) σε σχέση με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα της νιτροσουλώσεως (Εικόνα 1.18).

Η αντίστροφη αντίδραση της νιτροσουλώσεως είναι η **απονιτροσουλώση** (denitrosylation), δηλαδή οι πρωτεΐνες που έχουν οξειδωθεί μέσω νιτροσουλώσεως ανάγονται παρουσία ανηγμένης θειορεδοξίνης ή γλουταθειόνης.

**Εικόνα 1.18**

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των NO συνθασών καθορίζει τα πρωτεϊνικά υποστρώματα της νιτροσουλώσεως. Η παραγωγή NO από την eNOS, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου, οδηγεί στη νιτροσουλώση πρωτεϊνών του ΣΔ, όπως τα κανάλια υποδοχής ρυανοδίνης (RyR2) και η Ca^{2+} -ΑΤΡάση SERCA. Ο υποδοχέας της ρυανοδίνης έχει 84 κατάλοιπα Cys, από τα οποία νιτροσουλώνονται τα δώδεκα, οδηγώντας στην αύξηση της αγωγιμότητας Ca^{2+} . Επιπλέον, η παραγωγή NO από την eNOS, η οποία βρίσκεται σε περιοχές πλούσιες σε καβεολίνες - σχεδίες λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη των καρδιακών μυϊκών κυττάρων (σαρκεΐλημα), οδηγεί στη νιτροσουλώση των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} και στη μείωση της διαπερατότητάς τους. Το NO που παράγεται από διαφορετικές υποκυτταρικές θέσεις έχει αντίθετα αποτελέσματα στη σύσπαση των καρδιομυοκυττάρων. [12]

3.3

Ένζυμα ως διακόπτες που υδρολύουν ενεργειακά πλούσιες χημικές ενώσεις

Από πολύ νωρίς τα κύτταρα έμαθαν να αποθηκεύουν την ενέργεια που αποκτάται από τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και άλλες στοιχειώδεις μεταβολικές διαδικασίες σε μεταβολίτες που περιέχουν ενεργειακά πλούσιους χημικούς δεσμούς, και κυρίως στον άνυδρο δεσμό φωσφορικού οξέος των τριφωσφορικών νουκλεοζιτών, NTPs (όπως ATP και GTP). Οι περισσότερες κυτταρικές αντιδράσεις, όπως η βιοσύνθεση των μακρομορίων, η δημιουργία βαθμίδωσης της συγκέντρωσης ιόντων εκατέρωθεν των κυτταρικών μεμβρανών (που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δυναμικού μεμβράνης), οι αντιδράσεις μεταφοράς, καθώς και η πλειοψηφία των αντιδράσεων μεταγωγής σήματος συνδέονται με την υδρόλυση των NTPs.

Στις συνθήκες ενός ζωντανού κυττάρου η υδρόλυτική διάσπαση του δεσμού της γ-φωσφορικής ομάδας των NTPs, αν και ισχυρά εξεργονική, δεν πραγματοποιείται

αυθόρμητα αλλά απαιτεί κατάλυση, στην οποία συμμετέχουν δύο τύποι ενζύμων: οι **νουκλεοσιδικές τριφωσφατάσες** (NTPάσες: ATPάσες, GTPάσες) και οι **κινάσες**. Οι NTPάσες μεταφέρουν το κατάλοιπο γ-φωσφορικού του NTP (ATP, GTP) στο H_2O , παράγοντας ελεύθερα ανόργανα φωσφορικά (P_i). Οι κινάσες μεταφέρουν το κατάλοιπο γ-φωσφορικού στα πυρηνόφιλα κατάλοιπα άλλων μορίων, τα οποία φωσφορυλιώνονται ($R-XH \rightarrow R-XP$). Σε ένα δεύτερο βήμα, που καταλύεται από μια φωσφατάση ή πραγματοποιείται αυθόρμητα, το κατάλοιπο φωσφορικού μεταφέρεται στο H_2O , αποδίδοντας φωσφορικό οξύ.

Οι τριφωσφατάσες της γουανοσίνης και της αδενοσίνης (GTPάσες και ATPάσες) και οι πρωτεϊνικές κινάσες/φωσφατάσες είναι ιδιαίτερα άφθονα συστήματα διακόπτες του πρωτεϊνικού δικτύου επεξεργασίας σήματος. Ενώ οι NTPάσες επιφέρουν μη ομοιοπολικές δομικές αλλαγές, οι κινάσες/φωσφατάσες καταλύουν ομοιοπολικές φωσφορυλιώσεις/αποφωσφορυλιώσεις των αντίστοιχων πρωτεϊνών τελεστών.

Οι δραστηριότητες όλων αυτών των ενζύμων ελέγχονται μέσω μιας τεράστιας ποικιλίας μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες, με μικρομοριακές ενώσεις, με περιβαλλοντικά ερεθίσματα, καθώς και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτά είναι τα εισερχόμενα σήματα που κατευθύνουν το σύστημα του διακόπτη είτε από το OFF στο ON είτε από το ON στο OFF.

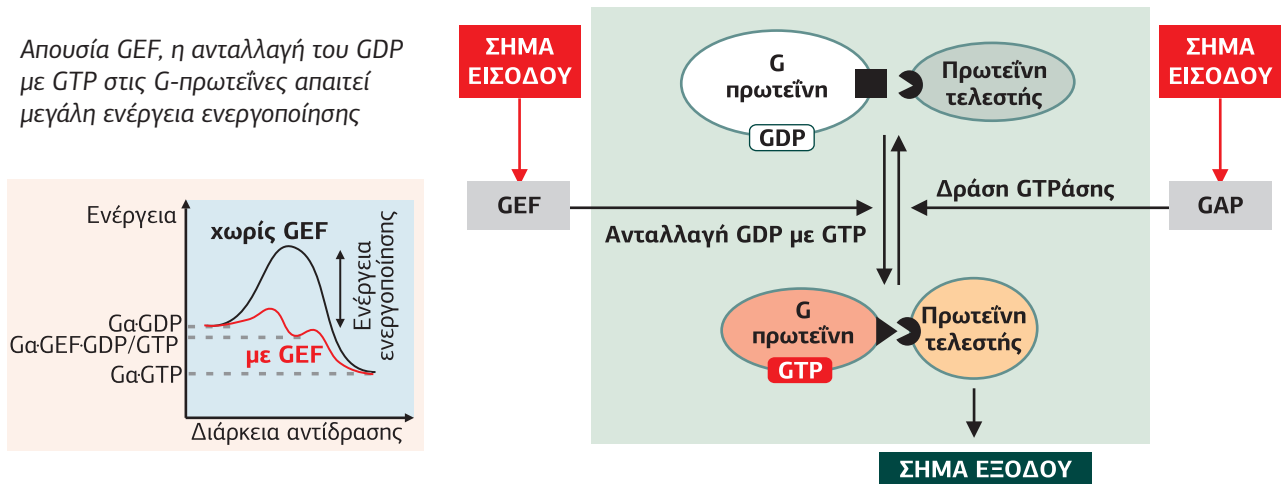
3.4 | G-πρωτεΐνες ή GTPάσες ως διακόπτες

Μία από τις πιο απλές και πιο διαδεδομένες αντιδράσεις που συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος είναι η υδρόλυση του GTP, η οποία καταλύεται από τις GTPάσες. Αυτή η αντίδραση αποδίδει τόση ελεύθερη ενέργεια όση και η υδρόλυση του ATP. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 παρατηρήθηκε ότι η λειτουργική απόκριση του ενεργοποιημένου υποδοχέα αδρεναλίνης απαιτούσε GTP. Ως πρωτεΐνη πρόσδεσης του GTP αναγνωρίστηκε μια GTPάση που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα (βλ. σελ. 249). Από τότε βρέθηκε ότι πολυάριθμες ρυθμιστικές GTPάσες ή G-πρωτεΐνες ανήκουν στον κεντρικό εξοπλισμό του πρωτεϊνικού δικτύου επεξεργασίας δεδομένων. Ως αρχέτυποι διακόπτες που χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του GTP, οι G-πρωτεΐνες εμπλέκονται σε όλους σχεδόν τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εξελικτικά προέρχονται από τους προκαρυωτικούς προγόνους τους.

Χρειάζεται να γίνει μια διάκριση μεταξύ “μικρών” και “μεγάλων” G-πρωτεϊνών. Οι μικρές G-πρωτεΐνες είναι μονομερή 200 περίπου αμινοξέων. Σύμφωνα με το αρχέτυπό τους, την πρωτεΐνη p21 Ras, ομαδοποιούνται στην επονομαζόμενη υπερικογένεια Ras. Οι μεγάλες G-πρωτεΐνες είναι ετεροτριμερή Gαβγ συμπλέγματα με την α-υπομονάδα (όμοια με τη Ras) να έχει δράση GTPάσης.

Οι G-πρωτεΐνες επάγουν αντιστρεπτές στερεοδομικές αλλαγές, αντί για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες τελεστές τους. Με έναν υποδειγματικό τρόπο οι G-πρωτεΐνες επιδεικνύουν δύο βασικά χαρακτηριστικά της μεταγωγής σήματος: α. τη σύνδεση των διαδικασιών σηματοδότησης με μια βιοχημική αντίδραση παροχής ενέργειας και β. τον χωρικό και χρονικό έλεγχο της σηματοδότησης. Μια G-πρωτεΐνη έχει συνδεδεμένο GDP στη διαμόρφωση 0 και GTP στη διαμόρφωση 1, με μία αναλογία 1:1. Όταν η G-πρωτεΐνη έχει συνδεδεμένο το GTP, αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες τελεστές, αλλάζοντας τη διαμόρφωση και τη λειτουργία τους με έναν χρονοεξαρτώμενο τρόπο ή δρώντας ως ένας οργανωτής που τις τοποθετεί σε καθορισμένες υποκυτταρικές θέσεις, όπως η κυτταρική μεμβράνη, όπου έρχονται σε επαφή με άλλες πρωτεΐνες και σχηματίζουν σηματοδοτικά συμπλέγματα. Αυτές οι λειτουργικές μετατροπές και η αλλαγή στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών τελεστών αντιπροσωπεύουν τα σήματα εξόδου του διακόπτη G-πρωτεΐνης.

Η ενεργοποίηση, ή αλλιώς η ανταλλαγή του GDP με GTP, πρέπει να επιταχυνθεί ενζυμικά και γι' αυτόν τον λόγο είναι ένας σταθμός για τα σήματα εισόδου. Η



ίδια αρχή ισχύει και για την αντίστροφη αντίδραση, την υδρόλυση του GTP. Όντας GTPάσες, οι G-πρωτεΐνες είναι ικανές να γυρίσουν πίσω στη θέση OFF από μόνες τους. Ωστόσο, η δράση τους ως GTPάσες (και άρα η διάρκεια της ενεργής κατάστασης) ρυθμίζεται από άλλα εισερχόμενα σήματα σε ποικίλο βαθμό (**Εικόνα 1.19**).

Παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης: Επάγουν τη σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών

Στις G-πρωτεΐνες η ανταλλαγή του GDP με το GTP ευνοείται θερμοδυναμικά από το πλεόνασμα GTP στο κύτταρο, αλλά λόγω της εξαιρετικά ισχυρής σύνδεσης του GDP (και του GTP) στην G-πρωτεΐνη απαιτείται μεγάλη ενέργεια ενεργοποίησης και χρειάζονται ώρες για να προκύψει αυτόματα. Επομένως, πρέπει να καταλύεται ενζυμικά (για τον ίδιο λόγο οι G-πρωτεΐνες δεν υπάρχουν στα κύτταρα σε ελεύθερη μορφή χωρίς συνδεδεμένο νουκλεοτιδίο γουανίνης). Τα αντίστοιχα ένζυμα καλούνται παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs). Κάθε G-πρωτεΐνη έχει έναν ή περισσότερους GEFs (το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περισσότερους από 1.000 GEFs). Ο GEF σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την G-πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη με το GDP. Το σύμπλοκο αυτό ελαττώνει την ισχύ της σύνδεσης ανάμεσα στο GDP και την G-πρωτεΐνη έως και 10^6 φορές, με αποτέλεσμα μια δραματική μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης (**Εικόνα 1.19**). Σε αυτήν την κατάσταση η ανταλλαγή GDP με GTP μπορεί να συμβεί σε 1 msec, με το πλεόνασμα του GTP να εκτοπίζει τον GEF από την G-πρωτεΐνη. Στην περίπτωση των ετεροτριμερών Gαβγ πρωτεϊνών τον ρόλο του GEF παίζει ο ενεργοποιημένος GPCR.

Πρωτεΐνες ενεργοποίησης GTPάσης: Τερματίζουν τη σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών

Η αντίδραση GTPάσης (υδρόλυση του GTP), η οποία τερματίζει τη σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από ένα βασικό κατάλοιπο αμινοξέος (κυρίως Arg) στο καταλυτικό κέντρο της G-πρωτεΐνης, που εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων και, συνεπώς, διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή του H_2O στο GTP. Οι μικρές G-πρωτεΐνες στερούνται το κρίσιμο κατάλοιπο Arg και γι' αυτό έχουν πολύ χαμηλή δραστηριότητα GTPάσης. Το κατάλοιπο Arg που λείπει παρέχεται από μια άλλη πρωτεΐνη που ονομάζεται πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPάσης (GAP: GTPase Activating Protein). Για να κυριολεκτήσουμε, οι μικρές G-πρωτεΐνες είναι ετεροδιμερείς GTPάσες, που αποτελούνται από μια καταλυτική υπομονάδα και μια ρυθμιστική υπομονάδα (GAP). Εκτός από τους GEFs, οι GAPs είναι στόχοι των εισερχόμενων σημάτων που ελέγχουν τη δραστηριότητα των G-πρωτεϊνών.

Σε αντίθεση με τις μικρές G-πρωτεΐνες, οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες έχουν μια περιοχική σύνδεσης του GTP περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτήν των μι-

Εικόνα 1.19

GTPάσες ως ελεγχόμενοι

χρονοδιακόπτες. Οι G-πρωτεΐνες ή GTPάσες όταν έχουν συνδεδεμένο το GDP δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη τελεστή. Μόνο όταν το GDP ανταλλάσσεται με GTP -ανταλλαγή που καταλύεται από τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης, GEF- η στερεοδιαμόρφωση της GTPάσης τροποποιείται αλλοστερικά, επιτρέποντας την επαφή με μια περιοχική πρόσδεσης της πρωτεΐνης τελεστή, η οποία αλλάζει δομικά και λειτουργικά. Ο διακόπτης επιστρέφει στο OFF από την ενδογενή δράση GTPάσης της G-πρωτεΐνης, που διεγείρεται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη ενεργοποίησης της GTPάσης GAP (κυρίως στην περίπτωση των μικρών G-πρωτεϊνών). Τα εισερχόμενα σήματα ελέγχουν τη δραστηριότητα του GEF ή της GAP, ενώ η λειτουργική αλλαγή της πρωτεΐνης τελεστή, που επιφέρεται από την G-πρωτεΐνη, αντιπροσωπεύει το σήμα εξόδου. [13]

κρών G-πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα η α-υπομονάδα τους να εμφανίζει έως και 10^4 φορές υψηλότερη δραστηριότητα GTPάσης σε σύγκριση με τις μικρές G-πρωτεΐνες. Ωστόσο, για πολλές μεγάλες G-πρωτεΐνες έχουν βρεθεί οι λεγόμενοι ρυθμιστές της σηματοδότησης των G-πρωτεϊνών (RGS, Regulators of G-protein signaling) που διεγείρουν την αντίδραση GTPάσης, κατά έναν σηματο-εξαρτώμενο τρόπο, αν και με μηχανισμό διαφορετικό από εκείνο των GAPs (βλ. σσ. 254-256).

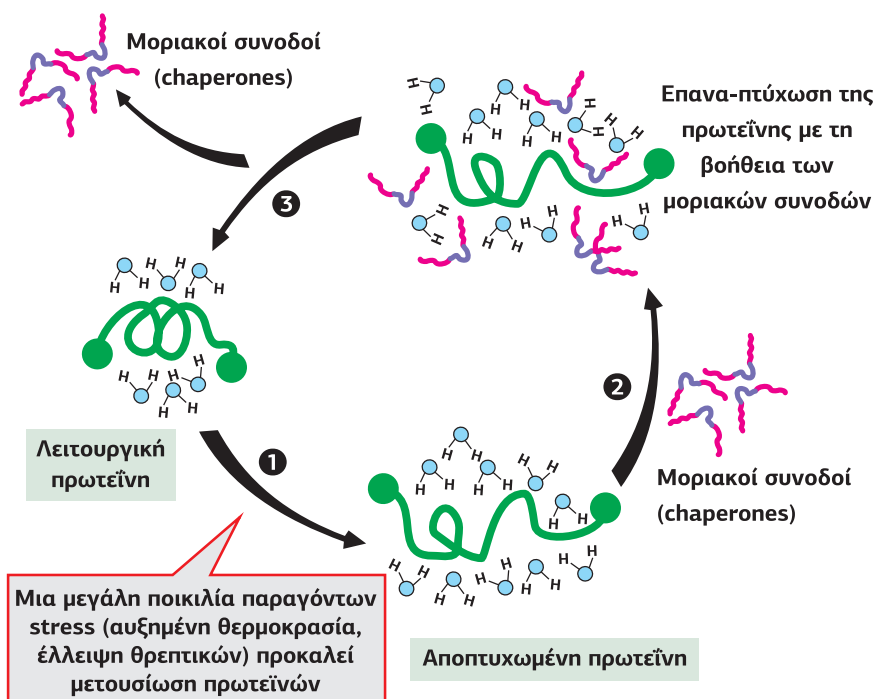
3.5 | ΑΤΡάσες ως διακόπτες

Ομοίως με τις GTPάσες, δύο οικογένειες ΑΤΡασών μπορούν εξειδικευμένα να τροποποιήσουν τη διαμόρφωση πρωτεϊνών και να ρυθμίσουν τη σύνδεση και την αποσύνδεση πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Αυτές οι οικογένειες περιλαμβάνουν τις **πρωτεΐνες συνοδούς** και τις **AAA+ πρωτεΐνες**. Και οι δύο τύποι είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών και για στοχευμένες φυσιολογικές διεργασίες σε κύτταρα.

Μοριακοί συνοδοί: καθιστούν τις πρωτεΐνες κατάλληλες για δράση

Οι μοριακοί συνοδοί (chaperones) είναι μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών, που βοηθούν στην πτύκωση πρωτεϊνών και στη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων. Είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση του υψηλού επιπέδου ευρυθμίας των κυττάρων. Οι τρέχουσες θεωρίες της πτύκωσης πρωτεϊνών βασίζονται στην υπόθεση ότι η φυσική κατάσταση μιας πρωτεΐνης αναπαριστά την πλέον ευνοϊκή θερμοδυναμικά διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία οργανώνεται αυθόρμητα από τη γενετικά καθορισμένη πρωτοταγή δομή της. Σε υδατικό περιβάλλον η ενέργεια για τη φυσική πτύκωση πηγάζει από την τάση των πρωτεϊνών να κρύψουν τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων στο εσωτερικό τους, δηλαδή να υιοθετήσουν μια διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας. Ωστόσο, η φυσική κατάσταση σε καμία περίπτωση δεν ταυτίζεται πάντα με τη λειτουργική κατάσταση. Μια αυθόρμητη πτύκωση με σκοπό τη φυσική διαμόρφωση έχει παρατηρηθεί μόνο για μικρές πρωτεΐνες υπό μη φυσιολογικές συνθήκες. Μεγαλύτερες πρωτεΐνες τείνουν να σχηματίσουν σταθερές, ημιτελώς πτυχωμένες ενδιάμεσες μορφές κατά τη διάρκεια της

Εικόνα 1.20
Ο ρόλος των πρωτεϊνών συνοδών στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Βοηθούν στην επαναπτύκωση μιας μετουσιωμένης πρωτεΐνης και στη δημιουργία της λειτουργικής της διαμόρφωσης, η οποία είναι θερμοδυναμικά ασταθής.



βιοσύνθεσης του πολυπεπτιδίου στο ριβόσωμα και να συσσωματώνονται μη ειδικά, λόγω της πολύ υψηλής συγκέντρωσής τους, σε τιμές 300-400 mg/ml, καθιστώντας έτσι το κυτταρόπλασμα ένα ημιστερεό μέσο. Επιπλέον, μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων stress, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης θερμοκρασίας και της έλλειψης θρεπτικών συστατικών, προκαλεί μετουσίωση πρωτεϊνών και αποτυχία της συναρμολόγησής τους (για τον λόγο αυτό ορισμένοι συνοδοί είναι γνωστοί ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ). Η διατάραξη της ορθής πτύχωσης των πρωτεϊνών και της συναρμολόγησης βλάπτει κυτταρικές λειτουργίες και ενδέχεται να έχει σοβαρές κυτταροτοξικές επιδράσεις με μοιραίες συνέπειες. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να προλαμβάνονται τέτοια ατυχήματα. Αυτός είναι ο ρόλος των **μοριακών συνοδών** (Εικόνα 1.20).

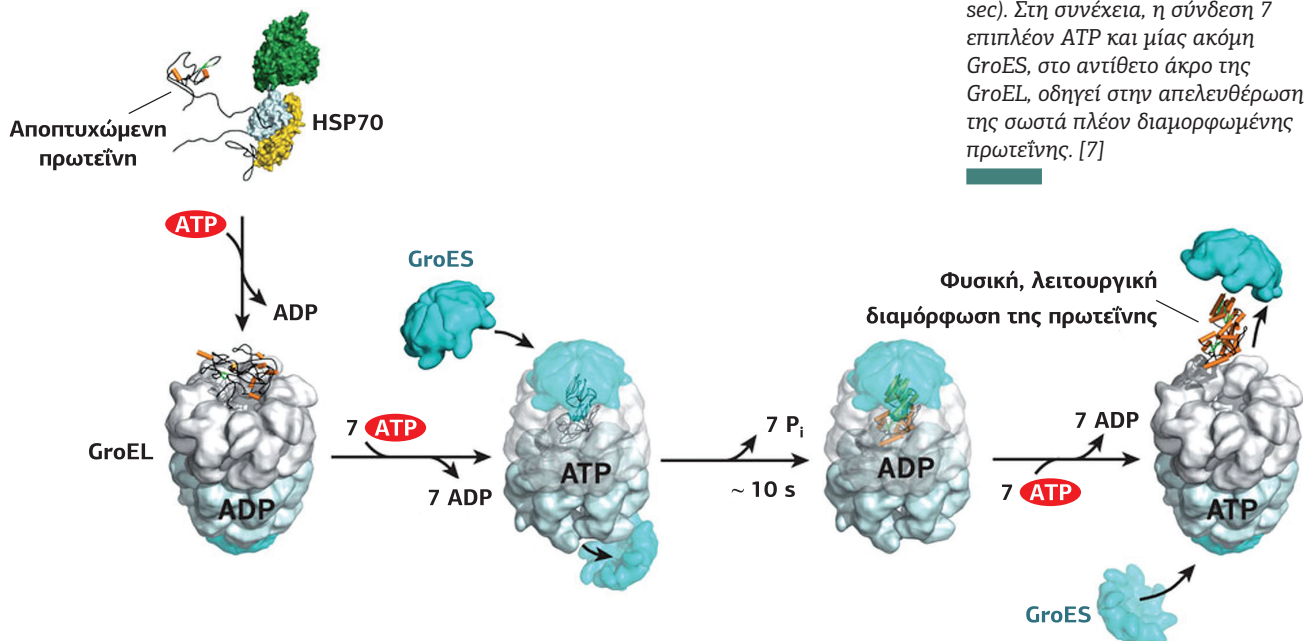
Καθώς οι μοριακοί συνοδοί παράγουν ευρυθμία, η δράση τους εξαρτάται από αντιδράσεις που προμηθεύουν ενέργεια, όπως η υδρόλυση του ATP. Για τον σκοπό αυτό έχουν είτε ενδογενή δραστηριότητα ATPάσης είτε συζεύγνυνται με ATPάσες.

Δύο τύποι πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η **HSP70** (Heat Shock Protein 70) και η **HSP90**, ανήκουν στον βασικό εξοπλισμό όλων των κυττάρων και συγκαταλέγονται μεταξύ των αφθονότερων πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος. Εκφράζονται σε πολυάριθμες ισομορφές και είναι απαραίτητες για την επιβίωση. Αυτές οι συνοδοί συνεργάζονται μεταξύ τους, και όχι μόνο προστατεύουν τις πρωτεΐνες από το stress, αλλά έχουν και επιπλέον σημαντικές λειτουργίες. Η συνοδός HSP70, η οποία βρίσκεται τόσο στα προκαρυωτικά όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα, προωθεί την πτύχωση πολυπεπτιδικών αλυσίδων που βρίσκονται σε διαδικασία αύξησης. Σε συνδυασμό με την HSP90 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική επεξεργασία του σήματος, επάγοντας τον σχηματισμό της λειτουργικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, η οποία είναι θερμοδυναμικά ασταθής. Για παράδειγμα, οι HSPs συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και στη δημιουργία της κατάλληλης διαμόρφωσης των πρωτεϊνικών κινασών, η οποία επιτρέπει τη φωσφορύλωση του βρόχου ενεργοποίησης. Όπως είναι χαρακτηριστικό για τις περισσότερες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, οι λειτουργικές μορφές HSP70 και HSP90 είναι διμερείς. Η λειτουργία των συνοδών κορυφώνεται με τις **chaperonins**, μεγάλα κυλινδρικά σύμπλοκα από συσσωματωμένους δακτυλίους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από 6-7 πρωτεΐνες συνοδούς (Εικόνα 1.21).

Οι πρωτεΐνες συνοδοί αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες πελάτες τους μέσω γραμμικών υδρόφοβων αλληλουχιών αμινοξέων, που συνήθως βρίσκονται εκτεθειμένες

Εικόνα 1.21

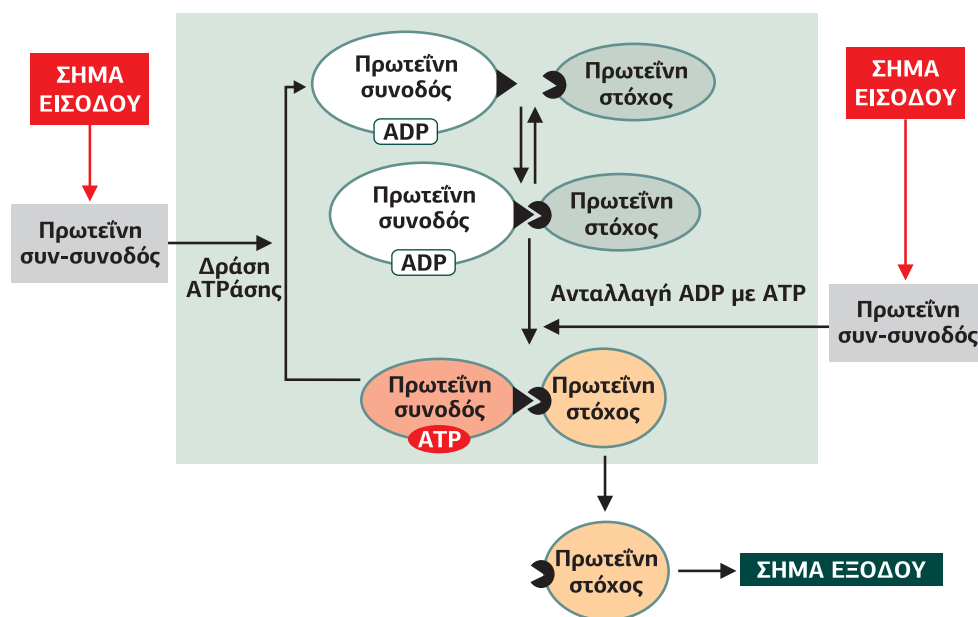
Οι chaperonins είναι μεγάλα κυλινδρικά σύμπλοκα που βοηθούν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Η chaperonin GroEL συναντάται σε μεγάλο βαθμό στα βακτήρια. Για τη σωστή λειτουργία της απαιτεί τη σύνδεση της πρωτεΐνης συν-συνοδού GroES. Η αποπτωχωμένη πρωτεΐνη, η οποία μεταφέρεται από την πρωτεΐνη συνοδό HSP70, συνδέεται σε μια υδρόφοβη περιοχή στο εσωτερικό της ανοικτής κοιλότητας της GroEL δημιουργώντας σύμπλοκο με την chaperonin. Η σύνδεση της αποπτωχωμένης πρωτεΐνης, σε συνδυασμό με τη σύνδεση 7 μορίων ATP, προσελκύει την GroES, η οποία συνδέεται ως καπάκι στην ανοικτή οπή της GroEL. Ως αποτέλεσμα, οι επιμέρους υπομονάδες της GroEL περιστρέφονται, έτσι ώστε η θέση σύνδεσης του υδρόφοβου υποστρώματος να απομακρύνεται από το εσωτερικό της κοιλότητας, οδηγώντας στη μετακίνηση της αποπτωχωμένης πρωτεΐνης σε έναν μεγάλο υδρόφιλο θάλαμο. Το υδρόφιλο περιβάλλον του θαλάμου εννοεί την απόκρυψη των υδρόφοβων αμινοξέων της πρωτεΐνης, βοηθώντας στην αναδίπλωσή της. Η πρωτεΐνη παραμένει μέσα στην chaperonin όσο χρόνο απαιτεί η υδρόλυση των 7 μορίων ATP (περίπου 10 sec). Στη συνέχεια, η σύνδεση 7 επιπλέον ATP και μίας ακόμη GroES, στο αντίθετο άκρο της GroEL, οδηγεί στην απελευθέρωση της σωστά πλέον διαμορφωμένης πρωτεΐνης. [7]



Εικόνα 1.22

Πρωτεΐνη συννοδός ως διακόπτης. Η πρωτεΐνη συννοδός, που φέρει ADP, αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με μια πρωτεΐνη πελάτη. Μετά την ανταλλαγή ADP-ATP η συννοδός αλλάζει τη διαμόρφωσή της και επάγει την αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης πελάτη. Αμέσως μετά την υδρόλυση του ATP, το σύμπλοκο συννοδού και πελάτη διασπάται και η συννοδός επιστρέφει στη διαμόρφωση με συνδεδεμένο το ADP. Σήματα εισόδου επηρεάζουν τόσο την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων όσο και την αντίδραση ATPάσης. Η μεταβολή διαμόρφωσης (και λειτουργίας) της πρωτεΐνης πελάτη είναι το σήμα εξόδου.

[13]

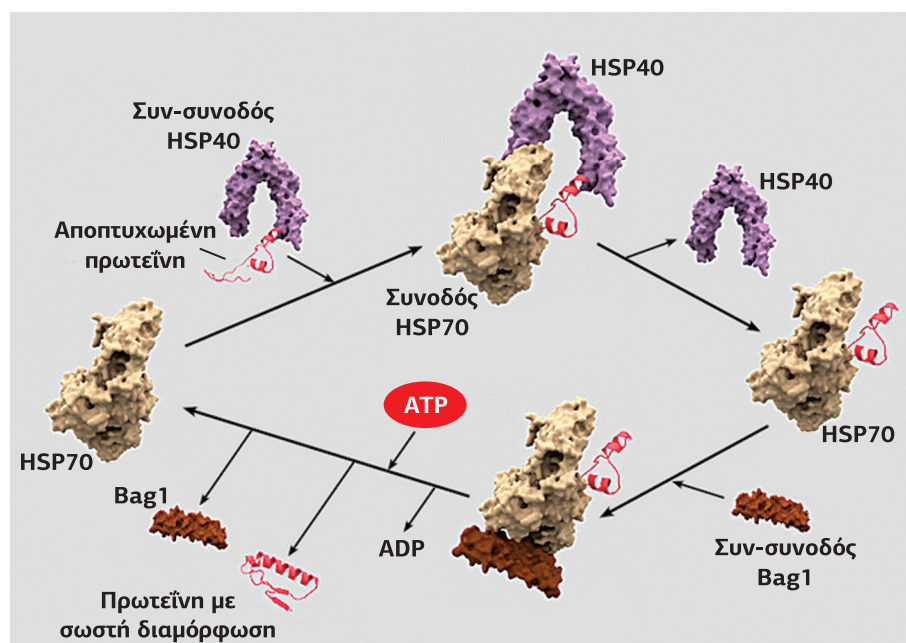


σε ανώριμες ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Για την πλήρη αναδίπλωση η πρωτεΐνη πελάτης υπόκειται σε αρκετούς κύκλους σύνδεσης και αποσύνδεσης από την πρωτεΐνη συννοδό, οι οποίοι καθοδηγούνται από την υδρόλυση του ATP. Όπως και οι G-πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες συννοδοί θεωρούνται ως διακόπτες ON-OFF. Στην κατάσταση OFF είναι φορτωμένες με ADP. Η διαδικασία της μετάβασης από την κατάσταση OFF στην κατάσταση ON περιλαμβάνει την ανταλλαγή ADP με ATP και τη δέσμευση της πρωτεΐνης πελάτη. Η τελευταία ενεργοποιεί τη λειτουργία ATPάσης της συννοδού της, προσλαμβάνοντας έτσι την ενέργεια που απαιτείται για τη μεταβολή της διαμόρφωσής της. Κατά το βήμα ON → OFF η τροποποιημένη πρωτεΐνη πελάτης αποχωρίζεται από τη συννοδό, η οποία επιστρέφει στην αρχική κατάσταση (Εικόνα 1.22).

Το σήμα εξόδου της πρωτεΐνης συννοδού είναι η λειτουργική διαμόρφωση της πρωτεΐνης πελάτη και, κατά συνέπεια, η ενεργοποίηση της λειτουργίας της. Για παράδειγμα, ένα ένζυμο αποκτά ενζυμική δραστηριότητα, μια σηματοδοτική πρωτεΐνη γίνεται ικανή να αλληλεπιδράσει με τους σηματοδοτικούς προσδέτες. Όταν οι

Εικόνα 1.23

Πρωτεΐνες συν-συννοδοί. Η ανταλλαγή του ADP με ATP, καθώς και η σύνδεση της πρωτεΐνης πελάτη, ελέγχονται από πρωτεΐνες συν-συννοδούς, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες συννοδούς μέσω ειδικών περιοχών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δραστηριότητα της πρωτεΐνης συννοδού HSP70, η οποία διεγείρεται μετά τη σύνδεση με πρωτεΐνες συν-συννοδούς, όπως η HSP40, η οποία βοηθάει στην πρόσδεση της πρωτεΐνης πελάτη και στην επιτάχυνση της υδρόλυσης του ATP, καθώς και η Bag1, η οποία βοηθάει μετά το τέλος της υδρόλυσης στην ανταλλαγή του ADP με ATP.



προσδέτες είναι άλλες πρωτεΐνες, τότε η συνοδός προωθεί τη δημιουργία λειτουργικών συμπλόκων. Στην πραγματικότητα, η δημιουργία δομών αποτελούμενων από πολλαπλές πρωτεΐνες, όπως οι chaperonins, τα νουκλεοσώματα και τα πρωτεασώματα, ελέγχεται από μια σειρά συνοδών υψηλού βαθμού εξειδίκευσης.

Τόσο η ανταλλαγή ADP-ATP όσο και η αντίδραση ATPάσης, ακόμη και η πρόσδεση της πρωτεΐνης πελάτη, ελέγχονται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες **συν-συνοδούς** που αλληλεπιδρούν με τις συνοδούς μέσω ειδικών περιοχών. Για παράδειγμα, η δραστηριότητα των συνοδών HSP70 ελέγχεται από πρωτεΐνες συν-συνοδούς, όπως η HSP40 και η Bag1. Η HSP40 βοηθάει στη σύνδεση της πρωτεΐνης πελάτη στην HSP70 και επιταχύνει την υδρόλυση του ATP, καθώς η HSP70 είναι μια πολύ ασθενής ATPάση, ενώ η Bag1 δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEF, nucleotide exchange factor), ενεργοποιώντας την ανταλλαγή του ADP με ATP στην πρωτεΐνη συνοδό (Εικόνα 1.23). Πριν αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη πελάτη της, η HSP70 έχει συνδεδεμένο το ATP. Μετά την υδρόλυση του ATP σε ADP, η πρωτεΐνη πελάτης απελευθερώνεται με τη λειτουργική της διαμόρφωση ή μεταφέρεται σε άλλες συνοδούς για επιπλέον επεξεργασία και το ADP ανταλλάσσεται με ATP, με τη βοήθεια της Bag1.

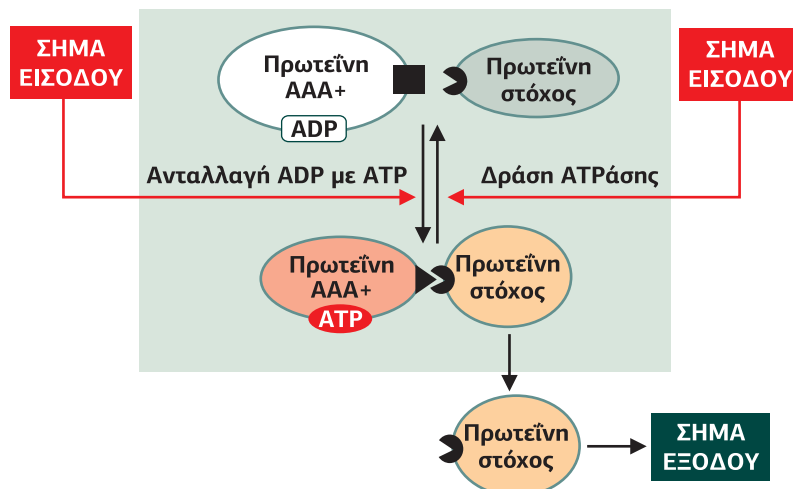
Επίσης, υπάρχουν πρωτεΐνες-συνοδοί που δρουν ως **πρωτεΐνες προσαρμογής**. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη HOP (HSP70/HSP90 Organizing Protein) συνδέεται ταυτόχρονα στην HSP70 και στην HSP90, μεταφέροντας την πρωτεΐνη πελάτη από τη μια συνοδό στην άλλη. Αυτή η ρύθμιση πολλαπλών σταδίων θυμίζει τον έλεγχο της λειτουργίας των GTPασών από GEFs και GAPs.

AAA+ πρωτεΐνες: Δημιουργία και διάσπαση των μακρομοριακών συμπλόκων

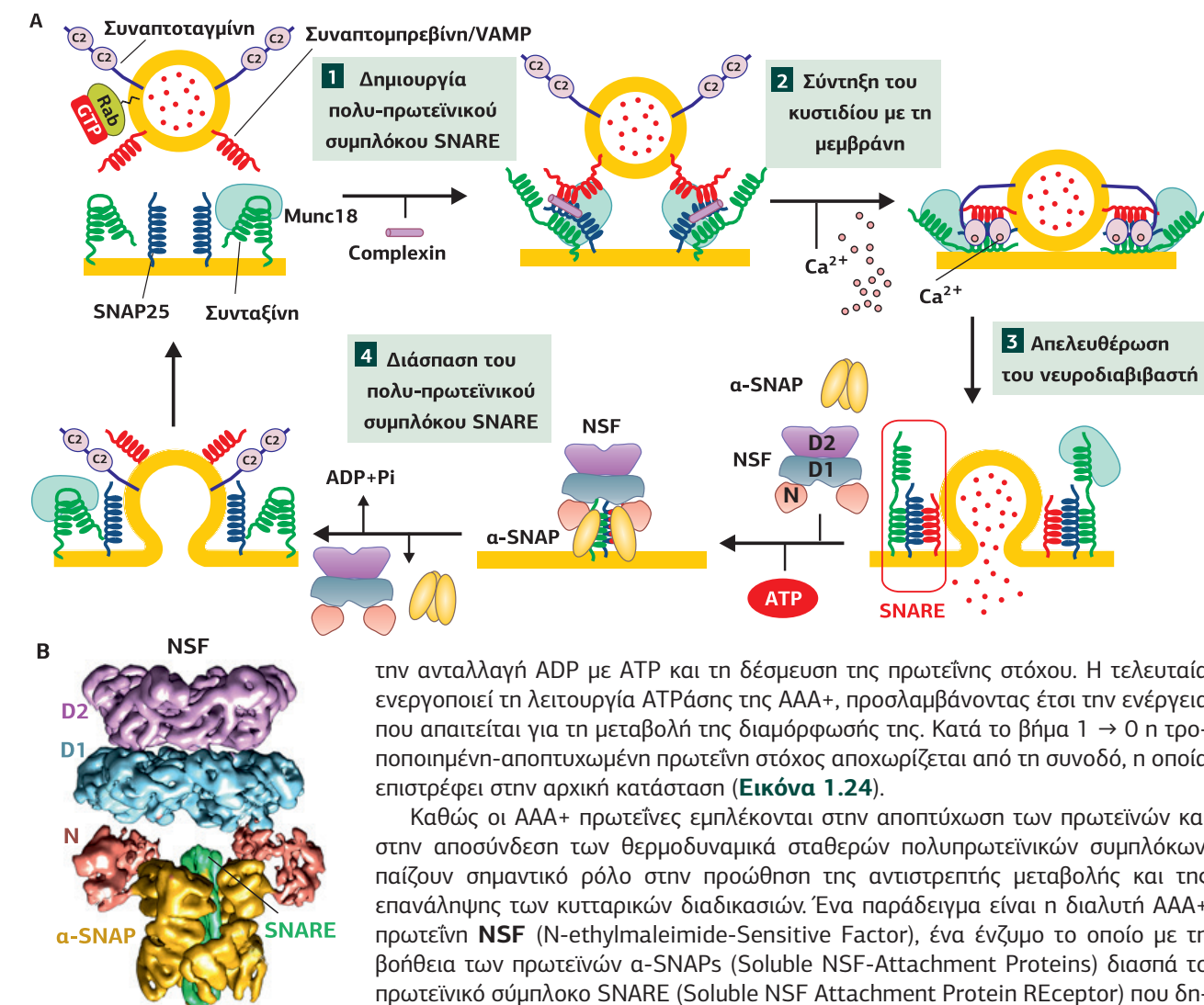
Οι AAA+ πρωτεΐνες (ATPases Associated with diverse cellular Activities) είναι ATPάσες που συνδέονται με ποικίλες κυτταρικές δραστηριότητες. Συνιστούν μια εξαιρετικά ποικιλόμορφη οικογένεια προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών πρωτεϊνών με μόνο κοινό δομικό χαρακτηριστικό έναν τομέα ATPάσης 240 περίπου αμινοξέων, που ονομάζεται μοτίβο AAA. Είναι ολιγομερή συμπλέγματα (συνήθως ομο-εξαμερή) που δημιουργούν μια δομή σε σχήμα δακτυλιδιού με μια οπή στο κέντρο (βλ. στην Εικόνα 1.25 το σχήμα του NSF).

Οι AAA+ πρωτεΐνες εμπλέκονται κατά κύριο λόγο στην αποπύκνωση των πρωτεϊνών και στην αποσύνδεση των θερμοδυναμικά σταθερών πολυπρωτεϊνικών ή νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-νουκλεϊνικών οξέων). Ωστόσο, παρατηρούνται μεταπτώσεις μεταξύ AAA+ πρωτεϊνών και συνοδών, καθώς ορισμένες AAA+ πρωτεΐνες συγκαταλέγονται μεταξύ των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Όπως οι G-πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες συνοδοί, έτσι κι οι πρωτεΐνες AAA+ θεωρούνται ως διακόπτες ON-OFF. Στην κατάσταση 0 είναι φορτωμένες με ADP. Η διαδικασία της μετάβασης από την κατάσταση 0 στην κατάσταση 1 περιλαμβάνει



Εικόνα 1.24
Πρωτεΐνες AAA+ ως διακόπτες. Οι πρωτεΐνες AAA+ στη διαμόρφωση OFF είναι συνδεδεμένες με το ADP. Η ανταλλαγή ADP με ATP από ένα σήμα εισόδου οδηγεί στη διαμόρφωση ON, η οποία συνδέει την πρωτεΐνη στόχο. Η σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου ενεργοποιεί την υδρόλυση του ATP από την AAA+, η ενέργεια που απελευθερώνεται αποπυκνώνει την πρωτεΐνη στόχο, ενώ η AAA+ επιστρέφει στη διαμόρφωση OFF με συνδεδεμένο το ADP. Και πάλι η τροποποιημένη, αποπυκνωμένη αυτή τη φορά, διαμόρφωση της πρωτεΐνης στόχου είναι το σήμα εξόδου. [13]



Εικόνα 1.25

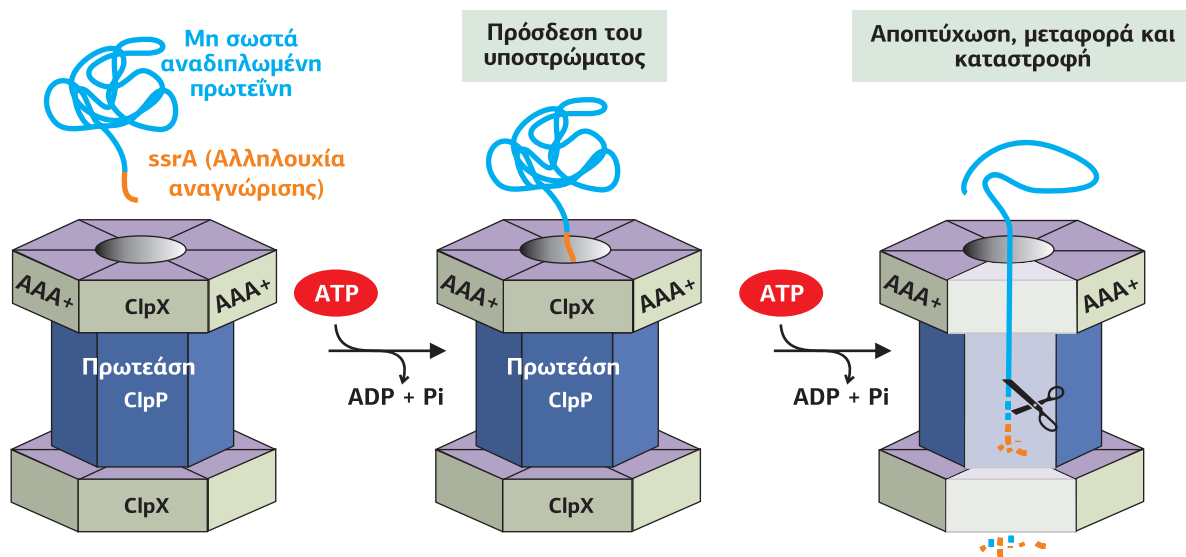
Η δράση της NSF, μιας πρωτεΐνης AAA+, στη διάσπαση του συμπλόκου SNARE.

A. Η συνταξίνη βρίσκεται στη μεμβράνη του προσυναπτικού νευρώνα σε μια κλειστή διαμόρφωση, η οποία χρειάζεται να ανοίξει, για να συνδεθεί με τις πρωτεΐνες των συναπτικών κυστιδίων συναπτομρεβίνη και VAMP και τη μεμβρανική SNAP25 και να δημιουργηθεί το σύμπλοκο SNARE, το οποίο θα οδηγήσει στη σύντηξη του συναπτικού κυστιδίου με τη μεμβράνη. Μετά τη σύντηξη το AAA+ ένζυμο NSF και οι πρωτεΐνες α -SNAPs διασπούν το σύμπλοκο SNARE, τα συστατικά του οποίου παραμένουν στη μεμβράνη, προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθούν. [9] B. Το 20S σύμπλοκο NSF - α -SNAP - SNARE.

την ανταλλαγή ADP με ATP και τη δέσμευση της πρωτεΐνης στόχου. Η τελευταία ενεργοποιεί τη λειτουργία ATPάσης της AAA+, προσλαμβάνοντας έτσι την ενέργεια που απαιτείται για τη μεταβολή της διαμόρφωσής της. Κατά το βήμα 1 $\rightarrow$ 0 η τροποποιημένη-αποτυχωμένη πρωτεΐνη στόχος αποχωρίζεται από τη συνοδό, η οποία επιστρέφει στην αρχική κατάσταση (Εικόνα 1.24).

Καθώς οι AAA+ πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αποτύχωση των πρωτεϊνών και στην αποσύνδεση των θερμοδυναμικά σταθερών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην προώθηση της αντιστρεπτής μεταβολής και της επανάληψης των κυτταρικών διαδικασιών. Ένα παράδειγμα είναι η διαλυτή AAA+ πρωτεΐνη NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor), ένα ένζυμο το οποίο με τη βοήθεια των πρωτεϊνών α -SNAPs (Soluble NSF-Attachment Proteins) διασπά το πρωτεϊνικό σύμπλοκο SNARE (Soluble NSF Attachment Protein REceptor) που δημιουργείται κατά τη σύντηξη των εκκριτικών συναπτικών κυστιδίων με τη μεμβράνη του προσυναπτικού νευρώνα, καθιστώντας τα συστατικά του συμπλόκου SNARE επαναχρησιμοποιήσιμα (Εικόνα 1.25).

Μια άλλη κατηγορία AAA+ πρωτεϊνών είναι οι **AAA+ πρωτεάσες**, που περιλαμβάνουν εκτός από το μοτίβο AAA+ και μια καταλυτική περιοχή πρωτεάσης, η οποία βρίσκεται είτε στην ίδια είτε σε μια ξεχωριστή πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η περιοχή ATPάσης ελέγχει την ποιότητα της πρωτεΐνης και δρα είτε ως μοριακός συνοδός για τις πολυμερείς και μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες είτε, σε συνεργασία με το πρωτεολυτικό της τμήμα, δρα ως πρωτεάση που καταστρέφει την επιλεγμένη πρωτεΐνη. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι ATPασών Clp (Caseinolytic proteases) (ClpC, ClpE, ClpX και ClpY) που ανήκουν όλες στην οικογένεια HSP100. Αυτές οι ATPάσες αναγνωρίζουν διαφορετικά υποστρώματα μέσα στο κύτταρο και χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να τα ξεδιπλώσουν μερικώς και τα παραδώσουν στο αντίστοιχο πρωτεολυτικό τμήμα τους (ClpP ή ClpQ), ώστε να καταστραφούν (Εικόνα 1.26). Αποικοδομούν τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες που δεν μπορούν πλέον να επανέλθουν στη φυσική τους διαμόρφωση και είναι δυνητικά βλαβερές για το κύτταρο. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος, στο μέτρο που τερματίζουν ή προωθούν τη σηματοδότηση, καταστρέφοντας διεγερτικές ή ανασταλτικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι. AAA+ πρωτεάσες με υψηλό επίπεδο οργάνωσης είναι τα **πρωτεασώματα**, τα οποία έχουν σχήμα βαρελιού και ειδικεύονται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών



που λαμβάνει χώρα σε ένα κοίλωμα στο εσωτερικό της δομής (βλ. **Εικόνα 1.43**).

Συνοψίζοντας, δύο οικογένειες ΑΤΡασών μπορούν να παίξουν ρυθμιστικό ρόλο στη σηματοδότηση: οι πρωτεΐνες συνοδοί, οι οποίες χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ΑΤΡ για τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης στόχου, προκαλώντας τη λειτουργική της διαμόρφωση και, κατά συνέπεια, ενεργοποιώντας τη λειτουργική της κατάσταση, και οι AAA+ πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα, καθώς χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ΑΤΡ για την αποπτύχωση της πρωτεΐνης στόχου, επάγοντας είτε την αποσύνδεση των πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση των συστατικών τους, είτε δρουν και ως πρωτεασώματα οδηγώντας στην καταστροφή μη σωστά διαμορφωμένων και βλαβερών για το κύτταρο πρωτεϊνών.

3.6 | Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση είναι η πλέον διαδεδομένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της δομής των πρωτεϊνών και επηρεάζει τουλάχιστον το 1/3 όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση αντιπροσωπεύει τη σημαντικότερη αντίδραση λειτουργίας διακόπτη της κυτταρικής επεξεργασίας δεδομένων, με το βήμα $0 \rightarrow 1$ να καταλύεται από πρωτεϊνικές κινάσες και το βήμα $1 \rightarrow 0$ να καταλύεται από φωσφατάσες των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών (**Εικόνα 1.27**). Υπάρχουν τρεις δότες φωσφορικών και προμθηυτές ενέργειας: το ΑΤΡ, το GTP (η CK2 και η CaMK-II χρησιμοποιούν και το GTP) και το φωσφοενολ-πυροσταφυλικό (PEP), κυρίως οι προκαρυώτες.

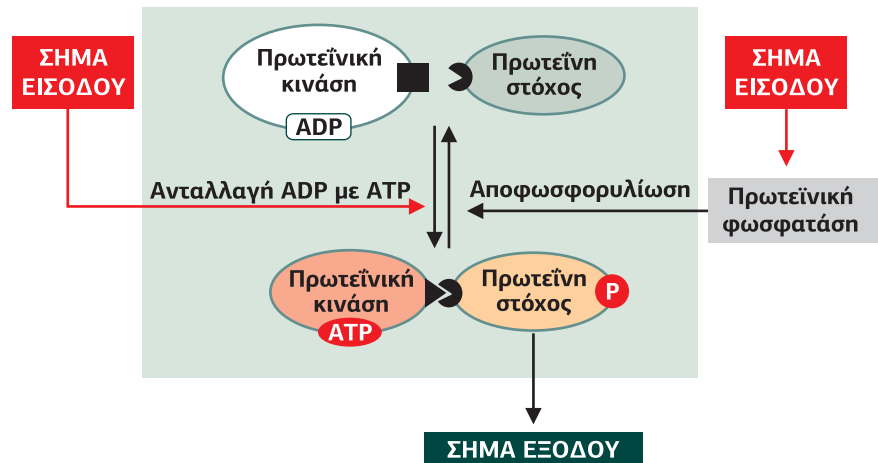
Είναι πάρα πολύ δύσκολο να αποσαφηνίσουμε τον πολύπλοκο ρόλο της φωσφορυλίωσης στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, σε ένα σηματοδοτικό μονοπάτι η πρωτεΐνη Α φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Β και η πρωτεΐνη Β φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Γ. Ωστόσο, η πρωτεΐνη Δ, η οποία συμμετέχει σε ένα άλλο μονοπάτι μπορεί να φωσφορυλιώσει την Α ή την Γ, μεταβάλλοντας τη δραστηριότητά τους. Μια συνολική προσέγγιση, η οποία βοήθησε στη συστηματική ανάλυση των πολύπλοκων δικτύων φωσφορυλίωσης είναι η **φωσφο-πρωτεομική**, μια υποκατηγορία της πρωτεομικής, η οποία μελετά τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει και να ποσοτικοποιήσει τις δυναμικές αλλαγές σε φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες στη διάρκεια του χρόνου. Για παράδειγμα, μετά τη διέγερση του κυττάρου από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα αναγνωρίστηκαν δυναμικές αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσης περίπου 6.000 θέσεων (**Εικόνα 1.28**). Μια άλλη προσέγγιση για την κατανόηση του δικτύου φωσφορυλί-

Εικόνα 1.26

Η δομή και η δράση των AAA+ πρωτεασών. Χαρακτηριστική AAA+ πρωτεάση είναι η Clp, η οποία είναι ένα μεγάλο ετερο-ολιγομερές σύμπλεγμα που αποτελείται από μία καταλυτική περιοχή ΑΤΡάσης και μία περιοχή πρωτεάσης. Η υπομονάδα ΑΤΡάσης ελέγχει την ποιότητα της πρωτεΐνης και δρα είτε ως μοριακός συνοδός για τις πολυμερείς και μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες είτε, σε συνεργασία με το πρωτεολυτικό της τμήμα, δρα ως πρωτεάση που καταστρέφει την επιλεγμένη πρωτεΐνη. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι Clp ΑΤΡασών (ClpC, ClpE, ClpX και ClpY) που ανήκουν όλες στην οικογένεια HSP100. Αυτές οι ΑΤΡάσες αναγνωρίζουν διαφορετικά υποστρώματα μέσα στο κύτταρο, τα ξεδιπλώνουν μερικώς και τα παραδίδουν στο αντίστοιχο πρωτεολυτικό τμήμα τους (ClpP ή ClpQ), ώστε να καταστραφούν. [15]

Εικόνα 1.27

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών ως διακόπτης. Ο διακόπτης αποτελείται από μια πρωτεϊνική κινάση, μια πρωτεϊνική φωσφατάση και την πρωτεΐνη υποστρώμα. Σε περίπτωση απουσίας του ATP η πρωτεϊνική κινάση είναι ανενεργή (εδώ εμφανίζεται ως φέρονσα ADP). Η ενεργή κινάση μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα (P) από το ATP στην πρωτεΐνη στόχο, η διαμόρφωση και η λειτουργία της οποίας αλλάζει, αποτελώντας το σήμα εξόδου. Μια φωσφατάση θέτει τον διακόπτη πίσω στο 0. Σήματα εισόδου ελέγχουν την ενεργοποίηση της κινάσης και της φωσφατάσης. [13]

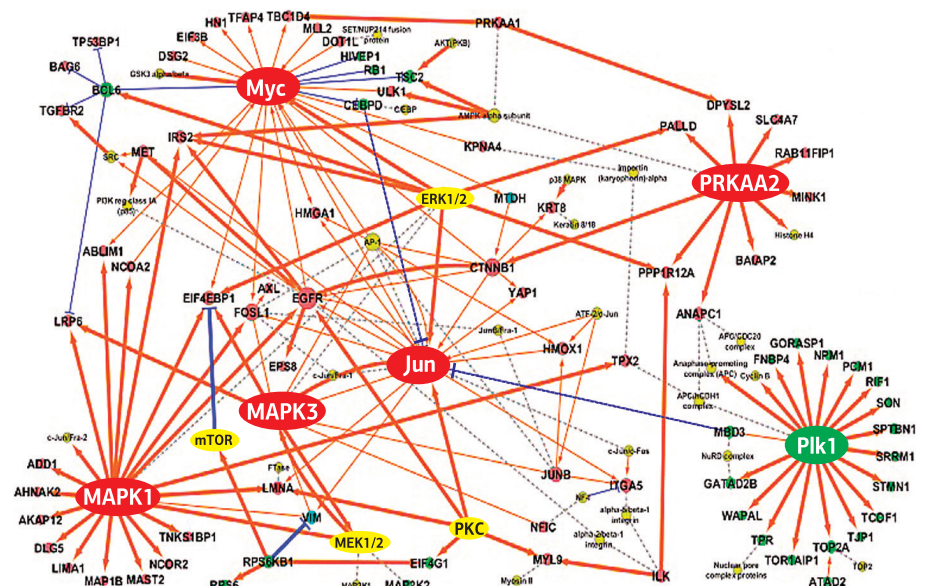


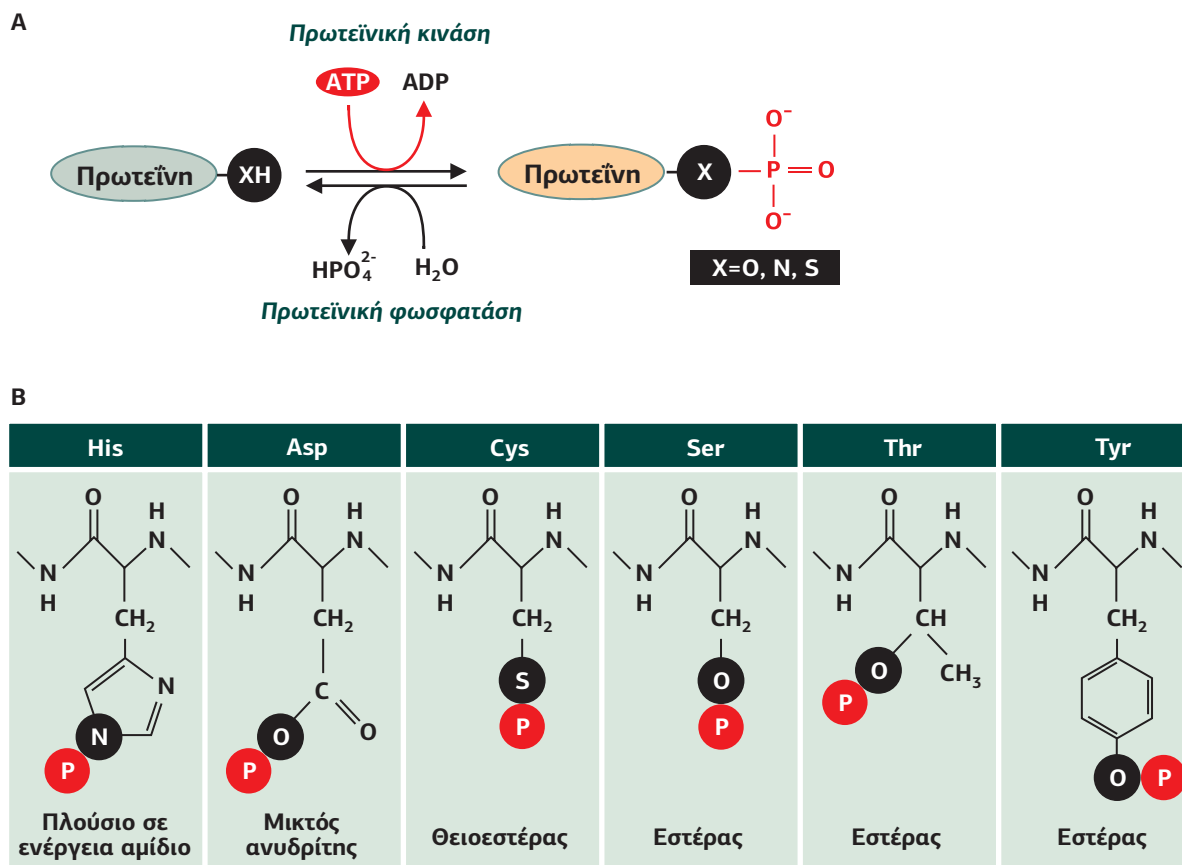
σης αφορά τη μέτρηση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες με τους στόχους τους.

Οι στόχοι της φωσφορυλίωσης είναι τα αμινοξέα Ser, Thr και Tyr (τα οποία αποδίδουν εστέρες του φωσφορικού οξέος), His (η οποία αποδίδει ένα πλούσιο σε ενέργεια, ασταθές αμίδιο φωσφορικού οξέος), Asp (το οποίο αποδίδει ένα οξύ μικτού ανυδρίτη) και Cys (που αποδίδει έναν ασταθή θειοεστέρα φωσφορικού οξέος) (Εικόνα 1.29). Οι πρωτεϊνικές κινάσες δεν φωσφορυλιώνουν ελεύθερα αμινοξέα. Το αμινοξύ που μπορεί να φωσφορυλιωθεί είναι ενσωματωμένο σε μια σύντομη ακολουθία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης. Αυτή, η αποκαλούμενη **συναινετική ακολουθία φωσφορυλίωσης**, αναγνωρίζεται ειδικά από έναν εξειδικευμένο τύπο πρωτεϊνικής κινάσης. Ανάλογα με το αν μια συναινετική ακολουθία φωσφορυλίωσης βρίσκεται μόνο σε μερικές, σε λίγες ή πολλές πρωτεΐνες, η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση ενδέχεται να είναι είτε ένα έντονα επιλεκτικό γεγονός με υψηλό βαθμό “ιδιαιτερότητας” είτε μια πιο “δημόσια” αντίδραση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών πρωτεϊνών στόχων, η οποία επαναλαμβάνεται. Ωστόσο, ακόμη και εκείνες οι πρωτεϊνικές κινάσες που δεν έχουν υψηλό βαθμό επιλεκτικότητας, γιατί η συναινετική ακολουθία που αναγνωρίζουν και φωσφορυλιώνουν είναι άφθονη μεταξύ των πρωτεϊνών, είναι ικανές να επιλέξουν μεμονωμένα υποστρώματα, αλληλεπιδρώντας με επιπλέον θέσεις δέσμησης (docking sites), στοχεύοντας υπομονάδες και πρωτεΐνες σκαλωσιές (βλ. σελ.15, Περιοχές αγκυροβόλεια).

Εικόνα 1.28

Η TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) έχει αναδειχθεί ως ένας νέος θεραπευτικός στόχος για ορισμένους τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Για να αναγνωριστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η TBK1 επάγει την επιβίωση και να βρεθούν οι στόχοι φωσφορυλίωσης δημιουργήθηκαν TBK1 knockdown κύτταρα, τα οποία ενεργοποιήθηκαν από τον EGF. Συνολικά, εντοπίστηκαν 2080 φωσφοπρωτεΐνες, εκ των οποίων οι 385 επηρεάστηκαν μετά από TBK1 knockdown. Κεντρικό ρόλο φαίνεται να παίζει η κινάση Polo-Like Kinase 1 (Plk1), της οποίας τα φωσφορυλιωμένα επίπεδα μειώθηκαν αισθητά (συμβολίζεται με πράσινο κύκλο). Τα επίπεδα άλλων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, όπως η Myc, η MAPK1 (ή ERK2) και MAPK3 (ή ERK1), η Jun και η PRKAA2 αυξήθηκαν αισθητά (συμβολίζονται με κόκκινους κύκλους), υποδηλώνοντας ότι δεν είναι άμεσοι στόχοι της TBK1. Τα πορτοκαλί βέλη συμβολίζουν φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση ενώ οι μπλε γραμμές αναστολή. [10]





Πρωτεϊνικές κινάσες: έχουν κεντρικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μία από τις πιο γνωστές οικογένειες ενζύμων. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν βρεθεί 518 γονίδια κινάσων (1,7% του συνόλου των γονιδίων, η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων), καθώς και περισσότερα από 100 ανενεργά ψευδογονίδια. Οι αντίστοιχοι αριθμοί σε άλλα ευκαρυωτικά είδη είναι 130 (2,1%, η μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων) για τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, 454 (2,4%, η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων) για τη *Drosophila melanogaster* και 1.049 (4,1%, η μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων) για το *Arabidopsis thaliana*. Στους προκαρυώτες τα γονίδια πρωτεϊνικών κινάσων καλύπτουν, επίσης, ένα σημαντικό ποσοστό του γονιδιώματος.

Υπάρχουν δύο μεγάλες οικογένειες κινάσων: οι προκαρυωτικές **αυτοκινάσες ιστιδίνης** και οι **ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες**. Οι ευκαρυωτικές κινάσες, οι οποίες βρίσκονται και σε προκαρυώτες, καταλύουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων είτε της Ser και της Thr είτε της Tyr είτε, σε πολύ λίγες περιπτώσεις, και των τριών αμινοξέων. Δεν σχετίζονται με τις αυτοκινάσες της ιστιδίνης.

ΑΥΤΟΚΙΝΑΣΕΣ ΙΣΤΙΔΙΝΗΣ

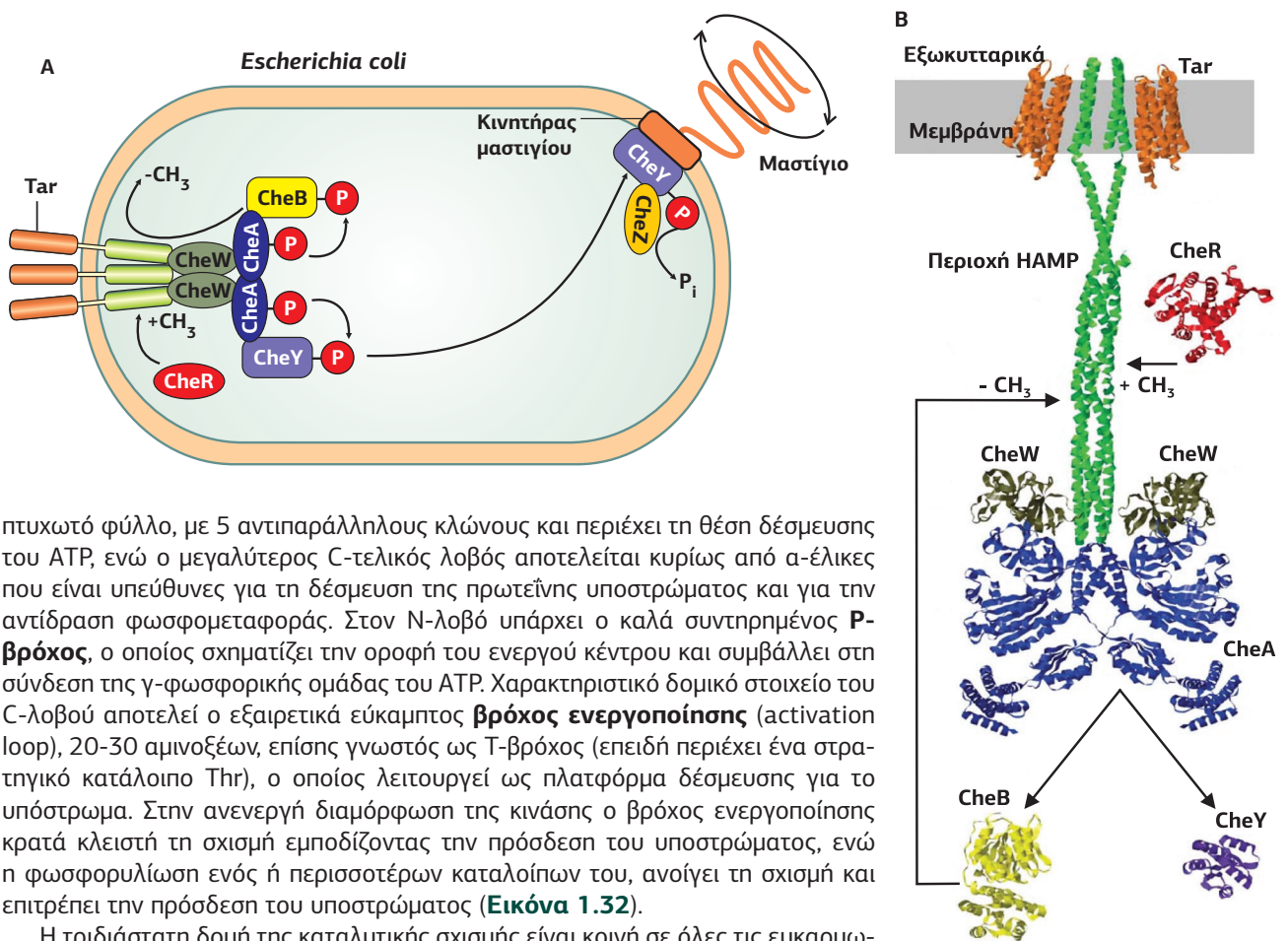
Οι αυτοκινάσες His είναι πολυλειτουργικές τρανσφεράσες, συνήθως ομοδιμερείς με δράση αυτοκινάσης, αλλά ταυτόχρονα και δραστηριότητα φωσφομεταφοράς και φωσφατάσης. Έχουν, επίσης, δράση κυτταρικών υποδοχέων (όπως οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης, RTKs).

Μια αυτοκινάση αποτελείται από: 1. Μια υπομονάδα υποδοχέα, που περιέχει μια εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης του ερεθίσματος, και μια κυτταροπλασματική περιοχή HAMP. Η περιοχή υποδοχέα δεν είναι καλά συντηρημένη, καθώς τα ερεθίσματα τα οποία επεξεργάζονται οι κινάσες His είναι ποικίλα. Η περιοχή HAMP (παρούσα σε κινάσες Histidine, Δενυλικές κυκλάσες, πρωτεΐνες που δέχονται Μεθυλομάδες και σε Phosphatases) είναι μια ελικοειδής περιοχή συνδέτης 50 αμινοξέων, που

Εικόνα 1.29

Βιοχημεία της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών.

A. Η φωσφορυλίωση ομάδων OH, NH ή SH μιας πρωτεΐνης καταλύεται από μια κινάση και η αποφωσφορυλίωσή τους από μια φωσφατάση. B. Διακρίνονται κατάλοιπα αμινοξέων που φωσφορυλιώνονται (οι μαύροι κύκλοι δείχνουν τη θέση X του δέκτη της φωσφορικής ομάδας, οι κόκκινοι κύκλοι συμβολίζουν τη φωσφορική ομάδα PO_3^{2-}). [13]



πτυχωτό φύλλο, με 5 αντιπαράλληλους κλώνους και περιέχει τη θέση δέσμευσης του ATP, ενώ ο μεγαλύτερος C-τελικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες που είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση της πρωτεΐνης υποστρώματος και για την αντίδραση φωσφομεταφοράς. Στον N-λοβό υπάρχει ο καλά συντηρημένος **P-βρόχος**, ο οποίος σχηματίζει την οροφή του ενεργού κέντρου και συμβάλλει στη σύνδεση της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP. Χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο του C-λοβού αποτελεί ο εξαιρετικά εύκαμπτος **βρόχος ενεργοποίησης** (activation loop), 20-30 αμινοξέων, επίσης γνωστός ως T-βρόχος (επειδή περιέχει ένα στρατηγικό κατάλοιπο Thr), ο οποίος λειτουργεί ως πλατφόρμα δέσμευσης για το υποστρώμα. Στην ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης ο βρόχος ενεργοποίησης κρατά κλειστή τη σχισμή εμποδίζοντας την πρόσδεση του υποστρώματος, ενώ η φωσφορυλίωση ενός ή περισσότερων καταλοίπων του, ανοίγει τη σχισμή και επιτρέπει την πρόσδεση του υποστρώματος (**Εικόνα 1.32**).

Η τριδιάστατη δομή της καταλυτικής σχισμής είναι κοινή σε όλες τις ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες. Η εξειδίκευση επιλεκτικής φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων αμινοξικών μοτίβων οφείλεται σε ανεπαίσθητες παραλλαγές της αλληλουχίας των αμινοξέων των θέσεων δέσμευσης του υποστρώματος, με αποτέλεσμα να μεταβληθεί το φορτίο και η υδροφοβικότητα. Οι κινάσες Tyr διαφέρουν από τις κινάσες Ser/Thr, καθώς περιέχουν μια βαθύτερη καταλυτική σχισμή, η οποία είναι σε θέση να φιλοξενήσει την ογκωδέστερη αρωματική πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου τυροσίνης.

Διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης

Οι διαφορετικές δομές μεταξύ των προκαρυωτικών αυτοκινάσων His και των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινάσων αντικατοπτρίζουν δύο ριζικά διαφορετικούς μηχανισμούς. Αμέσως μετά την ενεργοποίηση από ένα σήμα εισόδου, οι αυτοκινάσες His, οι οποίες συναντώνται ως ομοδιμερή, αυτοφωσφορυλιώνονται με μια διαδικασία που ονομάζεται **trans-αυτοφωσφορυλίωση**. Ο δεσμός της φωσφορικής ομάδας με το κατάλοιπο His είναι ασταθής, δηλαδή πλούσιος σε ενέργεια. Ως εκ τούτου, σε ένα είδος μηχανισμού ring-rong, η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται αμέσως σε άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται **ρυθμιστές απόκρισης (response regulators)**. Αυτοί είναι πρωτεϊνικές αυτοκινάσες που χρησιμοποιούν τις αυτοφωσφορυλιωμένες κινάσες His ως δότες φωσφορικών για αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων ασπαρτικού (Asp). Έτσι, η αυτοφωσφορυλίωση της His είναι μια βραχύβια μεταβατική κατάσταση μιας αντίδρασης φωσφομεταφοράς ανάμεσα σε δύο πρωτεΐνες (**Εικόνα 1.33A**).

Σε αντίθεση με τις αυτοκινάσες His, οι ευκαρυωτικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών στόχων με δότη φωσφορικών το ATP. Στις περισσότερες κινάσες στην καταλυτική τους περιοχή υπάρχει ένας **βρόχος ενεργο-**

Εικόνα 1.31

Κινάση His CheA, στα βακτήρια.

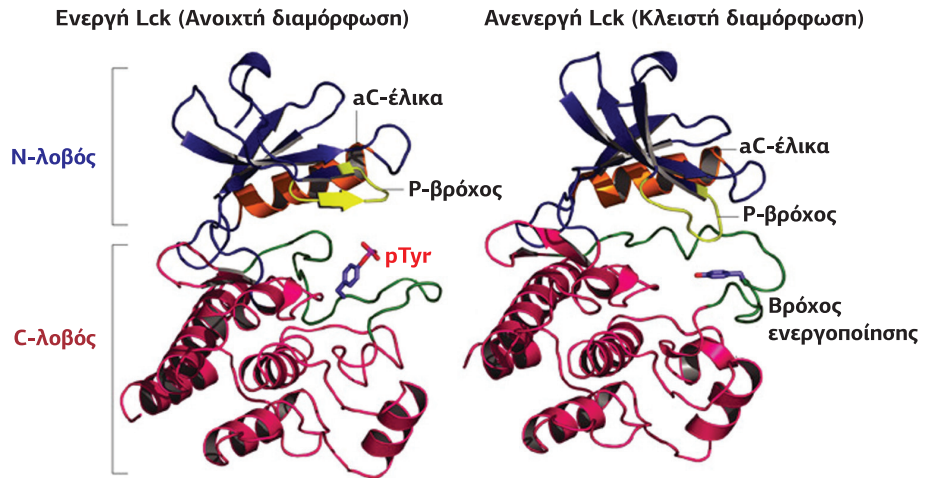
A. Η *Escherichia coli* μέσω ειδικών αισθητήρων, όπως ο Tar, αντιλαμβάνεται τη διαβάθμιση συγκέντρωσης θρεπτικών ή τοξικών ουσιών και αναπροσαρμόζει την κατεύθυνση της κίνησής της, μεταβάλλοντας τη φορά περιστροφής του μαστιγίου της. Ο μηχανισμός της χημειοτακτικής απόκρισης, εκτός από τον υποδοχέα, περιλαμβάνει την αυτοκινάση His CheA, τους ρυθμιστές απόκρισης CheY (ελέγχει την κίνηση του μαστιγίου) και CheB (απομεθυλιώνει τον υποδοχέα), και τις ιδιόσυστα ενεργές μεθυλοτρανσφεράση CheR και φωσφατάση CheZ, υπεύθυνες για τη λήξη του μηνύματος. [16] **B.** Διακρίνεται ο υποδοχέας Tar, η υπομονάδα CheW, η οποία συνδέει τον υποδοχέα με την περιοχή αυτοκινάσης CheA, καθώς και οι ρυθμιστές απόκρισης CheB και CheY.

Εικόνα 1.32**Δομή της καταλυτικής περιοχής των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινάσων.**

Διακρίνεται η κινάση τυροσίνης Lck, η οποία αποτελείται από δύο λοβούς, έναν μικρό N-τελικό λοβό, ο οποίος αποτελείται από ένα β-πτυκτώ φύλλο, με 5 αντιπαράλληλους κλώνους (μπλε) και μια α-έλικα (πορτοκαλί), και έναν μεγαλύτερο C-τελικό λοβό (κόκκινο), ο οποίος αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Οι δύο λοβοί συνδέονται με μια αλληλουχία εύκαμπτης άρθρωσης δημιουργώντας την καταλυτική σχισμή. Ο P-βρόχος είναι η θέση πρόσδεσης της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP, ενώ ο βρόχος ενεργοποίησης συμμετέχει στην πρόσδεση του υποστρώματος. Αλλαγές στον προσανατολισμό των δύο λοβών οδηγεί στο άνοιγμα και το κλείσιμο της σχισμής. [6]

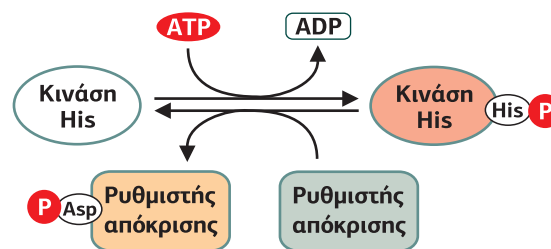
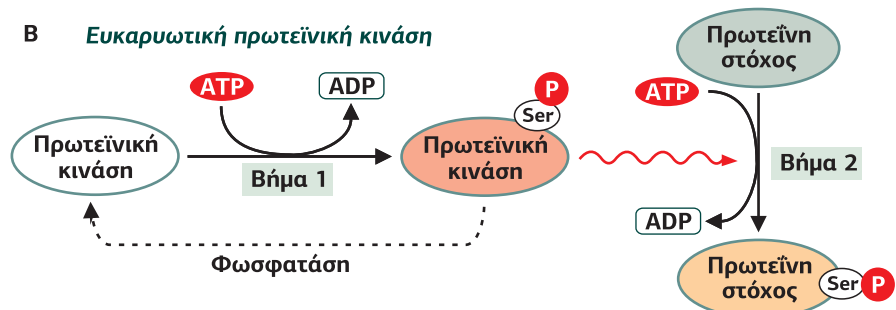
Εικόνα 1.33**Διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης στις προκαρυωτικές αυτοκινάσες His και τις ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες.**

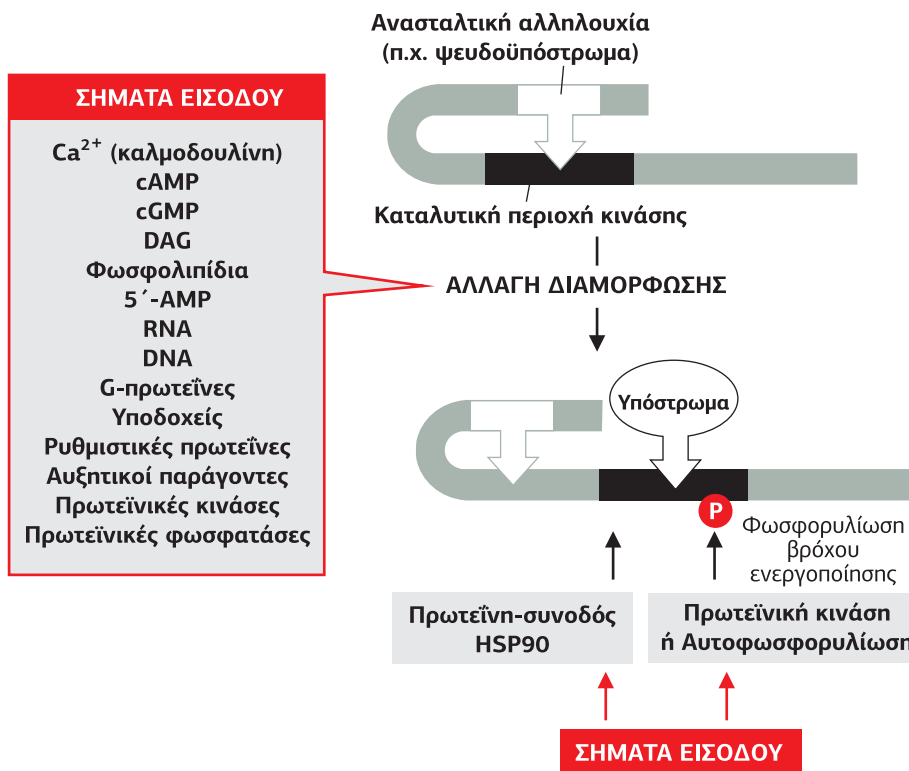
Α. Μετά την αυτοφωσφορυλίωσή τους οι αυτοκινάσες His παρέχουν φωσφορικές ομάδες σε πρωτεΐνες (ρυθμιστές απόκρισης), οι οποίες αυτοφωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα Asp. Β. Ευκαρυωτικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων με δότη φωσφορικών το ATP (Βήμα 2). Για να αποκτήσουν πλήρη ενζυμική δραστηριότητα, πολλές από αυτές πρέπει να υποστούν πρώτα αυτοφωσφορυλίωση ή να φωσφορυλιωθούν από μια άλλη κινάση (Βήμα 1). Σε αντίθεση με τις αυτοκινάσες His, η φωσφορυλίωση συμβαίνει σε υδροξυ-αμινοξέα, όπως οι Ser, Thr και Tyr (ROH). Οι φωσφορικές ομάδες που προστίθενται δεν μπορούν να μεταφερθούν σε άλλες πρωτεΐνες, αντί γι' αυτό αλλάζουν τη διαμόρφωση της κινάσης, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση με το ATP και το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Για να τερματιστεί η φωσφορυλίωση μια φωσφατάση είναι απαραίτητη για την αδρανοποίηση της φωσφορυλιωμένης κινάσης. [13]



ποίησης, ο οποίος στη διαμόρφωση Ο είναι κλειστός και εμποδίζει την επαφή του ATP και της πρωτεΐνης υποστρώματος. Για να παραμερίσει ο βρόχος ενεργοποίησης και να ανοίξει η καταλυτική σχισμή μεταξύ του N- και C-λοβού, επιτρέποντας την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο, πρέπει να φωσφορυλιωθεί σε ένα στρατηγικό κατάλοιπο Thr ή/και Tyr (**Εικόνα 1.32**). Αυτό επιτυγχάνεται είτε με αυτοφωσφορυλίωση είτε με φωσφορυλίωση από μια άλλη πρωτεϊνική κινάση. Αυτή η ρυθμιστική φωσφορυλίωση δεν είναι μια βραχύβια μεταβατική κατάσταση μιας αντίδρασης φωσφομεταφοράς, είναι μια σταθερή μετα-μεταφραστική τροποποίηση, που ενεργοποιεί το ένζυμο με αλλοστερική αλλαγή διαμόρφωσης (**Εικόνα 1.33B**).

Επίσης, οι περισσότερες κινάσες παρεμποδίζονται ενδογενώς από **ανασταλτικά μοτίβα**, τα οποία κρατούν κλειστό τον βρόχο ενεργοποίησης. Η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης, η οποία συμβαίνει μόνο παρουσία σημάτων εισόδου, απελευθερώνει το ένζυμο από τους ενδομοριακούς περιορισμούς και ανοίγει την καταλυτική σχισμή μεταξύ του N- και C-λοβού. Αλλά ακόμα και τότε, σε πολλές κινάσες ο βρόχος ενεργοποίησης ενδέχεται να μην είναι προσβάσιμος για φωσφορυλίωση, και πρέπει να αποκαλυφθεί με μια πρόσθετη διαμορφωτική αλλαγή που επάγεται από μια συνοδό ATPάση, όπως η HSP90. Επιπλέον, αυτή η συνοδός προστατεύει τις πρωτεϊνικές κινάσες από αποφωσφορυλίωση, παρατείνοντας έτσι την

A Προκαρυωτική αυτοκινάση His**B Ευκαρυωτική πρωτεϊνική κινάση**

**Εικόνα 1.34**

Η ενεργοποίηση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών. Σε μια ανενεργή πρωτεϊνική κινάση η καταλυτική περιοχή παρεμποδίζεται από μια ανασταλτική πεπτιδική αλληλουχία (π.χ. ψευδοϋπόστρωμα). Η αλληλεπίδραση με ένα σήμα εισόδου (οι διαφορετικές επιλογές εμφανίζονται στο πλαίσιο) επάγει μια διαμορφωτική αλλαγή με την οποία η ανασταλτική ακολουθία εκτοπίζεται και η καταλυτική περιοχή ανοίγει για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη υποστρώματος και το ATP. Για να αποκτήσουν πλήρη δραστηριότητα, πολλές πρωτεϊνικές κινάσες απαιτούν, επιπλέον, μια φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης στο καταλυτικό κέντρο από μία άλλη κινάση ή την αλλαγή της διαμόρφωσης του βρόχου ενεργοποίησης από μια πρωτεΐνη συνοδό, όπως η HSP90. [13]

ενεργή τους κατάσταση (Εικόνα 1.34).

Συχνά τα ανασταλτικά μοτίβα που σταθεροποιούν την ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης είναι **ψευδοϋποστρώματα**, δηλαδή πολυπεπτιδικές αλληλουχίες που μοιάζουν με τη συναινετική ακολουθία φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης υποστρώματος και δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο. Λόγω όμως έλλειψης του φωσφο-υποδεκτικού αμινοξέος (το οποίο αντικαθίσταται από μη φωσφορυλιώσιμο κατάλοιπο, όπως αυτό της Ser που αντικαθίσταται από αυτό της Ala), αυτές οι ακολουθίες δεν φωσφορυλιώνονται, αλλά δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς. Η αλληλεπίδραση της κινάσης με ένα σήμα εισόδου επάγει μια διαμορφωτική αλλαγή εκτοπίζοντας το ανασταλτικό ψευδοϋπόστρωμα από το καταλυτικό κέντρο (Εικόνα 1.34). Το ψευδοϋπόστρωμα μπορεί να είναι είτε ένα τμήμα της πρωτεϊνικής κινάσης (όπως στην περίπτωση της πρωτεϊνικής κινάσης C) είτε να εντοπίζεται σε ξεχωριστές υπομονάδες (όπως στην περίπτωση της πρωτεϊνικής κινάσης A).

Εκτός από τις αλληλουχίες ψευδοϋποστρώματος, και άλλες ανασταλτικές δομές μπορούν να επιφέρουν ενδογενή αυτοαναστολή, όπως οι περιοχές που περιέχουν ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο τυροσίνης, το οποίο αλληλεπιδρά ειδικά με συγκεκριμένες περιοχές SH2 που συνδέουν φωσφο-Tyr. Η ενεργοποίηση αυτού του τύπου των κινασών απαιτεί μια ενζυματική αποφωσφορυλίωση των κρίσιμων καταλοίπων Tyr ή μια ανταγωνιστική αλληλεπίδραση με μια πρωτεΐνη που έχει περιοχή σύνδεσης φωσφο-Tyr. Στις περισσότερες από αυτές τις κινάσες μια πρόσθετη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης είναι επιβεβλημένη (για παράδειγμα, στην κινάση τυροσίνης Src).

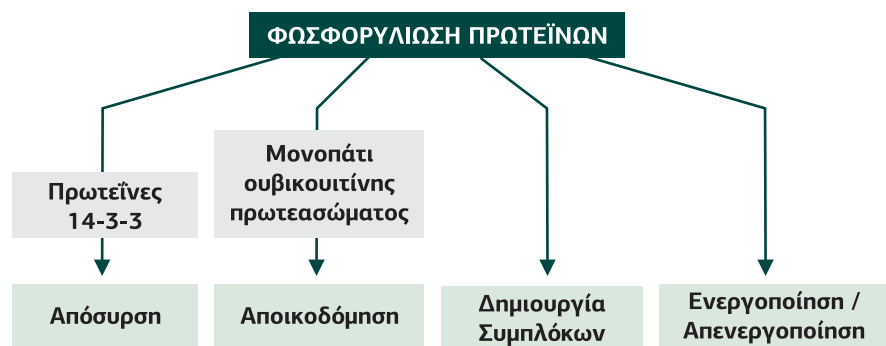
Κινάσες που απαιτούν τόσο τη μετατόπιση ενός αυτο-ανασταλτικού τομέα από το καταλυτικό κέντρο όσο και τη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης για να ενεργοποιηθούν, έχουν, τρόπος του λέγειν, μια διπλή κλειδαριά ασφαλείας και δύο (ή τρεις, αν χρειάζονται τη βοήθεια ενός συνοδού) ξεχωριστούς σταθμούς εισόδου για τη σηματοδότηση. Έτσι, μπορούν να επεξεργαστούν τουλάχιστον δύο διαφορετικά σήματα εισόδου. Λόγω αυτών των κλειδαριών ασφαλείας οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες είναι ανενεργές απουσία των σημάτων εισόδου. Υπάρχουν, βεβαίως, εξαιρέσεις στον κανόνα αυτό: για παράδειγμα, **η κινάση 3 της συνθάσης**

του γλυκογόνου (GSK-3), η οποία είναι ιδιόσυστατα ενεργή και αναστέλλεται μετά από φωσφορυλίωση της Ser9. Ωστόσο, είναι τελείως ασήμαντο αν το άνοιγμα ή το κλείσιμο του διακόπτη προκύπτει από αναστολή ή από ενεργοποίηση. Αυτό που έχει σημασία είναι ότι ο διακόπτης έχει γυρίσει.

Οι περιοχές που συνδέονται σε φωσφορυλιωμένα αμινοξέα ελέγχουν τον σχηματισμό, την αποικοδόμηση και την απόσυρση πρωτεϊνικών συμπλόκων

Πολλές πρωτεΐνες περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης, οι οποίες αναγνωρίζουν και δεσμεύουν αλληλουχίες με φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Ser, Thr ή Tyr. Ως εκ τούτου, μια άλλη σημαντική λειτουργία της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών είναι να δημιουργήσει τις συμπληρωματικές (φωσφορυλιωμένες) θέσεις, οδηγώντας σε αναστρέψιμες επαφές μεταξύ πρωτεϊνών (ή μεταξύ περιοχών μέσα στο ίδιο πρωτεϊνικό μόριο). Οι επαφές αυτές είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση των συμπλόκων και των δικτύων επεξεργασίας σημάτων. Περιοχές αλληλεπίδρασης με φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr είναι οι περιοχές SH2 και PTB, τα κατάλοιπα φωσφο-Ser αναγνωρίζονται από τις περιοχές 14-3-3, WW και MH2, ενώ τα κατάλοιπα φωσφο-Thr από τις περιοχές FHA και WD40 (βλ. **Πίνακας 1.2**). Αυτές οι περιοχές βρίσκονται σε μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών γεγονότων.

Εικόνα 1.35
Συνέπειες της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίησή της, την αποικοδόμηση ή την απόσυρσή της ή τέλος τη δημιουργία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. [13]



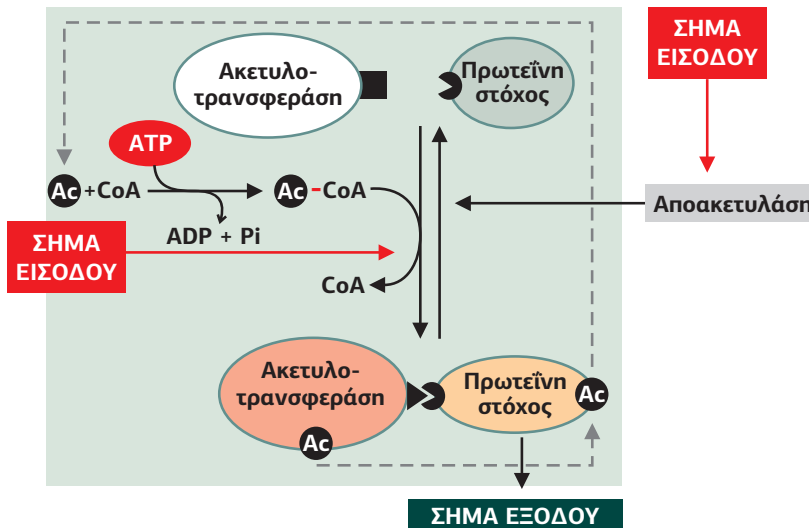
Εκτός από τον σχηματισμό των πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων σηματοδότησης, η αποικοδόμηση και η απόσυρση των πρωτεϊνών είναι μεγάλης σημασίας για τη μετάδοση του σήματος. Και στις δύο διαδικασίες η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο. Η πρωτεολυτική αποικοδόμηση πρωτεϊνών ενδέχεται να επηρεάσει τη σηματοδότηση τόσο με θετικό όσο και με αρνητικό τρόπο, ανάλογα με το κατά πόσον οδηγεί σε απελευθέρωση ενός ενεργού θραύσματος από μια ανενεργό πρόδρομο πρωτεΐνη ή σε πλήρη εξουδετέρωση της πρωτεΐνης. Ένα σημαντικό πρωτεολυτικό μονοπάτι χρησιμοποιεί την ουβικουιτίνη για τη στόχευση της πρωτεΐνης και τη μεταφορά της στα πρωτεασώματα. Η ουβικουιτίνωση καταλύεται από τρία ένζυμα, με τις **λιγάσες της ουβικουιτίνης** (ένζυμα E3) να έχουν την εξειδίκευση για την πρωτεΐνη στόχο. Πολλές λιγάσες της ουβικουιτίνης αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες υποστρώματά τους μόνο όταν αυτές έχουν φωσφορυλιωθεί. Επομένως, η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών λειτουργεί συνήθως ως έναυσμα για την ουβικουιτίνωση και την αποικοδόμηση.

Το ίδιο ισχύει και για την απόσυρση (sequestration) των πρωτεϊνών. Οι βασικοί παράγοντες σε αυτήν τη διαδικασία είναι οι **πρωτεΐνες 14-3-3**, οι οποίες αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες στόχους τους από ειδικές αλληλουχίες αμινοξέων που φέρουν φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Ser. Όπως και η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, η απόσυρση ενδέχεται να έχει τόσο αρνητικές όσο και θετικές επιδράσεις στη σηματοδότηση, γιατί είτε διατηρεί σε εφεδρεία την πρωτεΐνη για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα είτε διευκολύνει την ενσωμάτωσή της σε ένα σύμπλοκο σηματοδότησης.

3.7

Η ακετυλίωση των πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση

Εκτός από τη φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια επιπλέον μετα-μεταφραστική τροποποίηση με σηματοδοτικό χαρακτήρα. Καταλύεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες, οι οποίες μεταφέρουν μια ακετυλομάδα από το ακετυλοσυνένζυμο Α (ακετυλο CoA) στην ε-αμινομάδα της λυσίνης ή στη γουανιδινομάδα της αργινίνης της πρωτεΐνης στόχου. Αντιστοίχως, αποακετυλάσες υδrolύουν τον αμιδικό δεσμό και έτσι πραγματοποιείται η αντίστροφη διαδικασία. Και τα δύο ένζυμα ελέγχονται από σήματα εισόδου. Η αλλαγή στη διαμόρφωση και στη λειτουργία της ακετυλιωμένης πρωτεΐνης είναι το σήμα εξόδου. Η ενέργεια για το γύρισμα του διακόπτη παρέχεται από τη διάσπαση του πλούσιου σε ενέργεια θειοεστερικού δεσμού του ακετυλο-CoA. Η επανασύνδεση της ακετυλομάδας με το CoA απαιτεί ενέργεια (Εικόνα 1.36).



Εικόνα 1.36

Η ακετυλίωση ως αντίδραση διακόπτης. Με τη βοήθεια του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση, το οποίο ελέγχεται από σήματα εισόδου, μεταφέρεται η ακετυλομάδα από το ακετυλο-CoA σε μια Lys ή Arg της πρωτεΐνης στόχου. Η ενέργεια για τη μεταφορά της ακετυλομάδας προσφέρεται από τη διάσπαση του πλούσιου σε ενέργεια θειοεστερικού δεσμού του ακετυλο-CoA. Η αλλαγή στη διαμόρφωση της ακετυλιωμένης πρωτεΐνης είναι το σήμα εξόδου. Η ακετυλομάδα απομακρύνεται από την πρωτεΐνη με τη βοήθεια μιας αποακετυλάσης και επανασυνδέεται στο CoA μέσω μιας αντίδρασης που απαιτεί ενέργεια. [13]

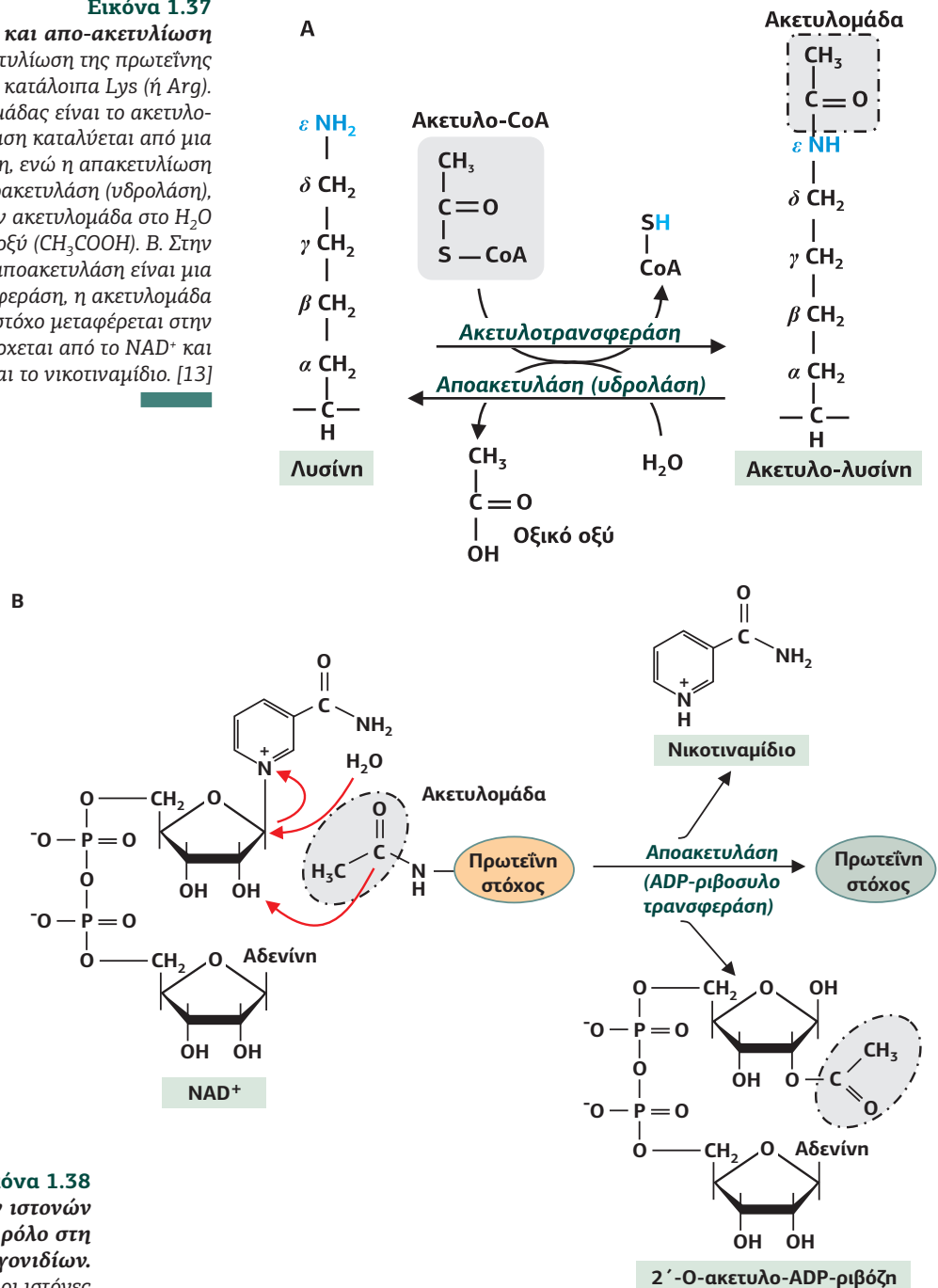
Και οι δύο τύποι ενζύμων υπάρχουν σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι φωσφατάσες διαφέρουν η μία από την άλλη στις ρυθμιστικές τους περιοχές. Αυτό σημαίνει ότι ανταποκρίνονται σε διαφορετικά σήματα και επιδεικνύουν διαφορετική εξειδίκευση στο υπόστρωμα. Οι αποακετυλάσες υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης: τις **υδρολάσες**, οι οποίες μεταφέρουν την ακετυλομάδα από την πρωτεΐνη στο H_2O παράγοντας οξικό οξύ (CH_3COOH) και τις **ADP-ριβουλοτρανσφεράσες**, οι οποίες μεταφέρουν την ακετυλομάδα στην ADP-ριβόζη που προέρχεται από το NAD^+ (Εικόνα 1.37).

Χαρακτηριστικές πρωτεΐνες, οι οποίες υφίστανται ακετυλίωση, είναι οι ιστόνες. Η ακετυλίωση των ιστονών οδηγεί στη διάσπαση των δεσμών ανάμεσα στο DNA και τις ιστόνες, στο ξεδίπλωμα ως εκ τούτου της χρωματίνης, και έχει έναν ρόλο κλειδί στη μεταγραφή των γονιδίων, με τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs, Histone Acetyltransferases) να δρουν ως μεταγραφικοί συν-επαγωγείς και τις αποακετυλάσες (HDACs, Histone Deacetylases) ως συν-καταστολείς (Εικόνα 1.38). Οι πιο γνωστές ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών είναι η **CBP** (CREB Binding Protein) και η ομόλογή της **p300** (300 kDa), οι οποίες αποτελούν πρότυπα μετα-μεταγραφικών συν-επαγωγέων. Λόγω του μεγάλου αριθμού αλληλεπιδράσεων με τη χρωματίνη μπορούν να σχηματίσουν εκτεταμένα σύμπλοκα που αποτελούνται από περισσότερα από 20 διαφορετικά μόρια, τα οποία συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, σε ξεχωριστές περιοχές των γονιδίων.

Μια χαρακτηριστική ομάδα αποακετυλασών με δράση ADP-ριβουλοτρανσφεράσης είναι οι **sirtuins**. Το όνομα SIR προέρχεται από το γονίδιο των ζυμομυκήτων "silent mating-type information regulation". Συναντώνται από τα βακτήρια έως τους ανθρώπους. Τα θηλαστικά εκφράζουν 7 sirtuins (SIRT1-7): SIRT1, SIRT6 και SIRT7 στον πυρήνα, όπου είναι υπεύθυνες για την απακετυλίωση των ιστονών, SIRT2 στο κυτταρόπλασμα, και SIRT3, SIRT4 και SIRT5 στα μιτοχόνδρια.

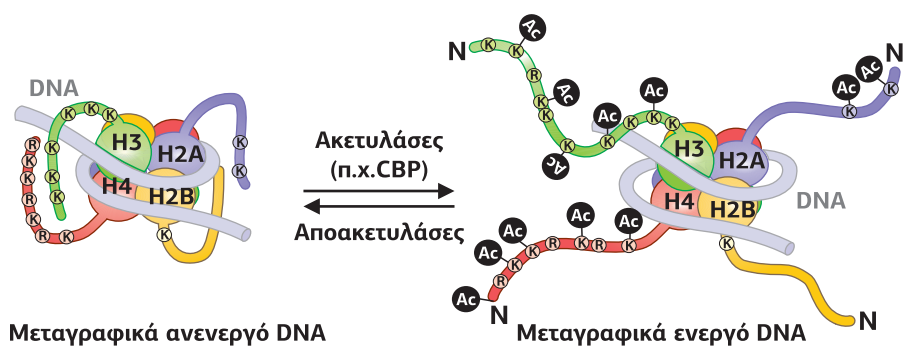
Εικόνα 1.37

Ακετυλίωση και απο-ακετυλίωση πρωτεϊνών. Α. Η ακετυλίωση της πρωτεΐνης στόχου συμβαίνει σε κατάλοιπα Lys (ή Arg). Ο δότης της ακετυλομάδας είναι το ακετυλο-CoA. Η αντίδραση καταλύεται από μια ακετυλοτρανσφεράση, ενώ η απακετυλίωση καταλύεται από μια αποακετυλάση (υδρολάση), η οποία μεταφέρει την ακετυλομάδα στο H_2O παράγοντας οξικό οξύ (CH_3COOH). Β. Στην περίπτωση που η αποακετυλάση είναι μια ADP-ριβοσυλοτρανσφεράση, η ακετυλομάδα από την πρωτεΐνη στόχο μεταφέρεται στην ADP-ριβόζη που προέρχεται από το NAD^+ και απομακρύνεται το νικοτιναμίδιο. [13]

**Εικόνα 1.38**

Η ακετυλίωση των ιστονών παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή των γονιδίων.

Στην εικόνα φαίνονται οι ιστόνες με περιελιγμένο το DNA, σε μεταγραφικά ανενεργή κατάσταση και σε ακετυλιωμένη, από την ακετυλοτρανσφεράση CBP/p300, μεταγραφικά ενεργή διαμόρφωση. Η ακετυλίωση των ιστονών οδηγεί στο ξετύλιγμα του DNA. Με αυτόν τον τρόπο αρχίζει η μεταγραφή του γονιδίου, καθώς στο σημείο αυτό προσελκύεται ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων και η RNA-πολυμέρωση II.



Ωστόσο, η ακετυλίωση των πρωτεϊνών σε καμιά περίπτωση δεν περιορίζεται μόνο στις ιστόνες, αλλά φαίνεται να έχει ανάλογη σημασία και εύρος με την πρωτεϊνική φωσφορυλίωση. Αυτό αληθεύει κυρίως για μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικές πρωτεΐνες (π.χ. NF-κB και p53). Η μεταφορά των πρωτεϊνών ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, η δυνατότητά τους να προσδένονται στο DNA και οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες συχνά διαμορφώνονται από την ακετυλίωση, τις περισσότερες φορές σε συνδυασμό με τη φωσφορυλίωση.

3.8

Ουβικουιτίνωση πρωτεϊνών: κάτι περισσότερο από ένα μήνυμα πρωτεϊνικής αποικοδόμησης

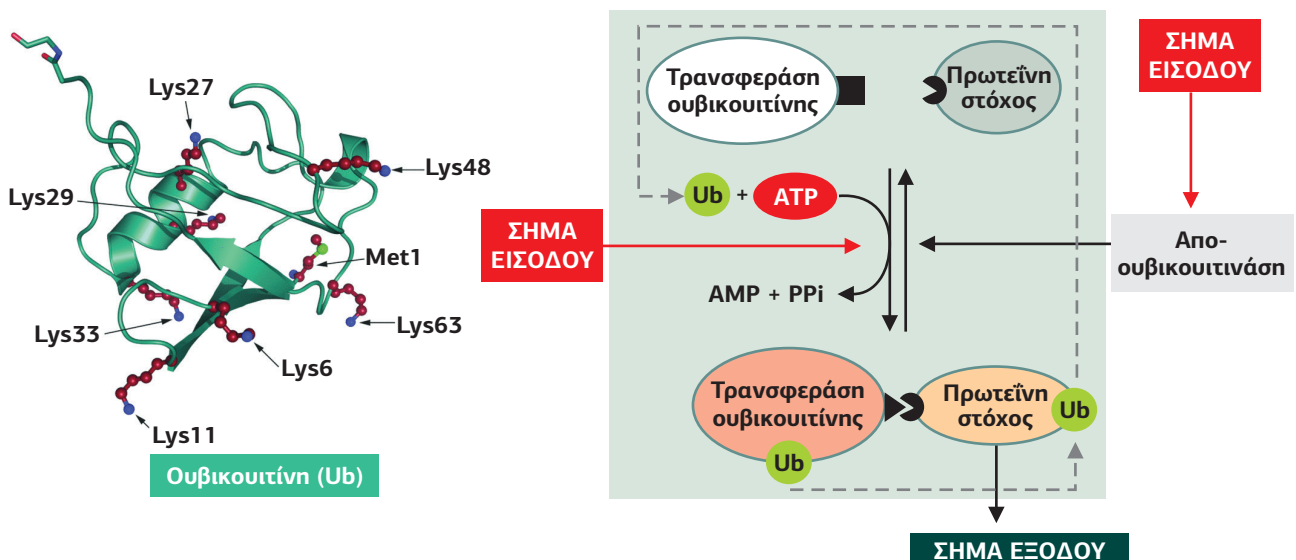
Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών επιτυγχάνονται όχι μόνο με την προσθήκη ομάδων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως φωσφορυλομάδων και ακετυλομάδων, αλλά επίσης και με την προσθήκη πεπτιδίων μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πεπτιδίου που συνδέεται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες είναι η **ουβικουιτίνη**, ένα θερμοανθεκτικό πεπτίδιο 8,5 kDa, που ανακαλύφθηκε το 1975 από τον Gerald Goldstein στα T- και B-λεμφοκύτταρα. Αποτελείται από 76 αμινοξέα και βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (ubiquitously), ενώ δεν έχει βρεθεί σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Η πρόσδεσή της στις πρωτεΐνες αποτελεί μια πολύ συνηθισμένη αντιστρεπτή σηματοδοτική διαδικασία, εφάμιλλη της φωσφορυλίωσης και της ακετυλίωσης. Με την κατανάλωση ενέργειας το ενζυμικό σύμπλεγμα μεταφοράς της ουβικουιτίνης, που αποτελείται από τα ένζυμα E1 (ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικουιτίνης), E2 (ένζυμο σύζευξης της ουβικουιτίνης) και E3 (λιγάση της ουβικουιτίνης), μεταφέρει την ουβικουιτίνη (Ub) στην πρωτεΐνη στόχο, από όπου μπορεί να απομακρυνθεί από μια απο-ουβικουιτινάση (**Εικόνα 1.39**).

Η ουβικουιτίνη, η οποία αν δεν είναι άμεσα διαθέσιμη απελευθερώνεται πρωτεολυτικά από μια πρόδρομη πρωτεΐνη, ενεργοποιείται με τη σύνδεσή της στο **ένζυμο E1** (ubiquitin-activating enzyme). Η σύνδεση ουβικουιτίνης-E1 πραγματοποιείται μέσω ενός **θειοεστερικού δεσμού** ανάμεσα στο COOH-τελικό άκρο της Gly76, το τελευταίο αμινοξύ του COOH-τελικού άκρου της ουβικουιτίνης και στη σουλφυδρυλική ομάδα μιας κυστεΐνης του ενζύμου E1. Το ένζυμο E1 για να δημιουργήσει τον θειοεστερικό δεσμό Gly76-Cys πρέπει πρώτα να υδρολύσει το ATP, αντίδραση που αποτελεί τον διακόπτη ενεργοποίησης της ουβικουιτίνωσης. Από το ένζυμο E1 η ουβικουιτίνη παραλαμβάνεται από το **ένζυμο E2** (ubiquitin-conjugating enzyme) με τον προσωρινό σχηματισμό θειοεστερικού δεσμού. Το **ένζυμο E3** (ubiquitin

Εικόνα 1.39

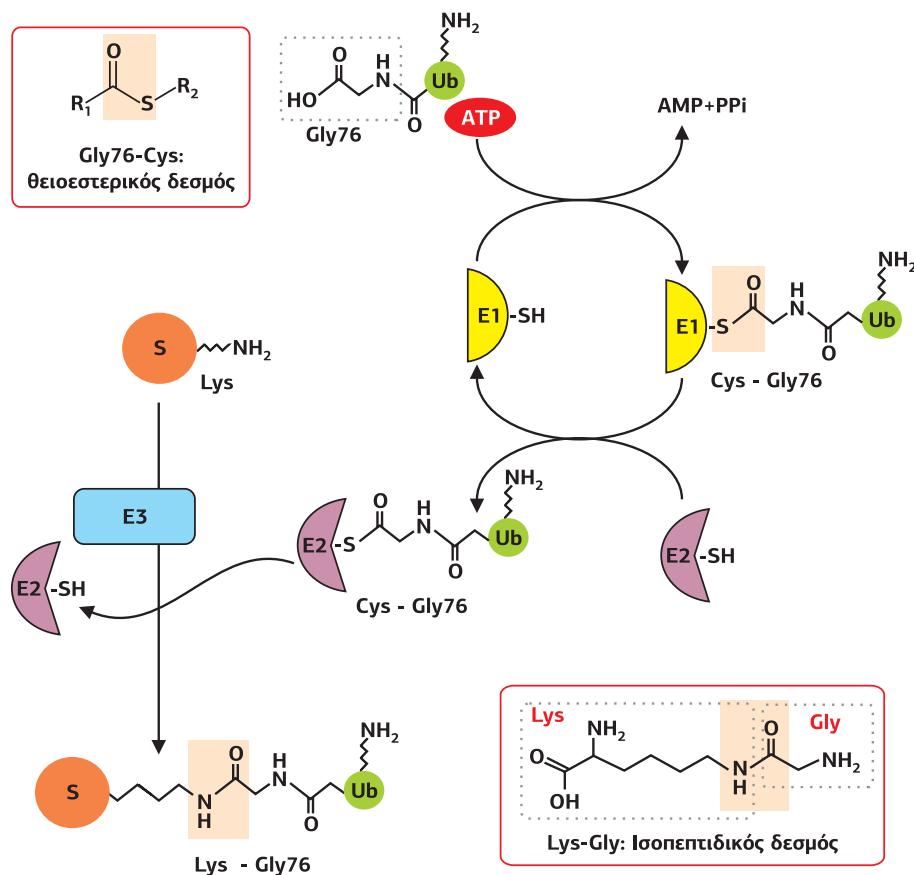
Ουβικουιτίνωση ως διακόπτης.

Η ουβικουιτίνωση ως διαδικασία διακόπτης μοιάζει κατά βάση με τη διαδικασία διακόπτη της φωσφορυλίωσης. Το ενζυμικό σύμπλεγμα ουβικουιτίνωσης (E1, E2, E3) υδρολύοντας το ATP, μεταφέρει την ουβικουιτίνη (Ub) στην πρωτεΐνη στόχο, από όπου μπορεί να απομακρυνθεί από μια απο-ουβικουιτινάση. Η μεταφορά της ουβικουιτίνης και η απο-ουβικουιτινάση ελέγχονται από σήματα εισόδου. Η αλλαγή στη διαμόρφωση και τη λειτουργία της πρωτεΐνης στόχου, που προκαλεί η ουβικουιτίνωση, είναι το σήμα εξόδου. [13]



Εικόνα 1.40**Μονο-ουβικουτίνωση.**

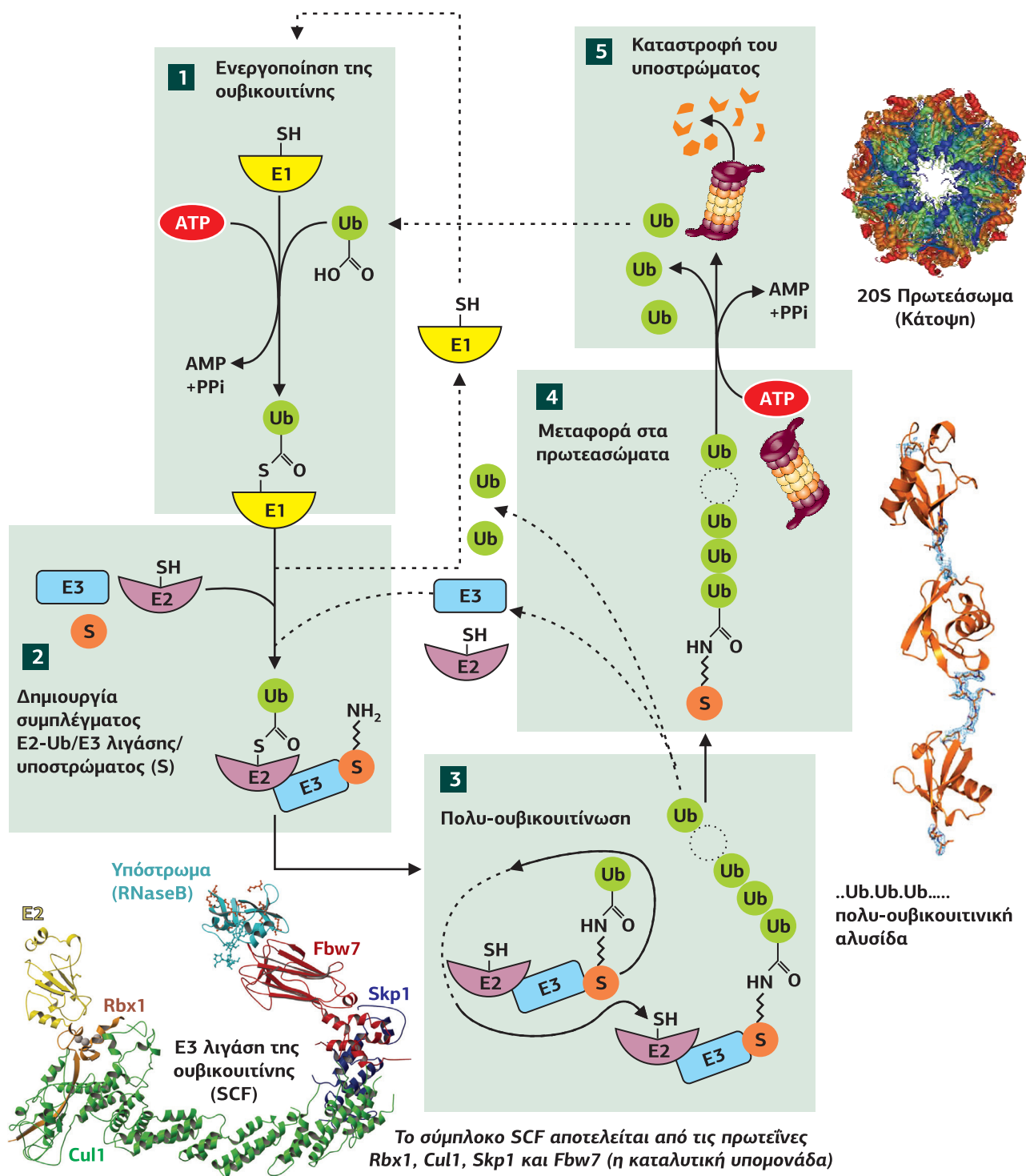
Η μεταφορά της ουβικουτίνης στην πρωτεΐνη στόχο πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο τριών συνεργαζόμενων ενζύμων: E1, E2 και E3. Το E1 συνδέει την ουβικουτίνη (Ub) ως ένα πλούσιο σε ενέργεια θειοεστέρα μέσω ενός δεσμού Gly76-Cys υδρολύοντας ένα μόριο ATP. Το E2 προσλαμβάνει την ουβικουτίνη από το E1 και την συνδέει μέσω ενός πλούσιου σε ενέργεια θειοεστέρα δεσμού. Το ένζυμο E3 δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς, καθώς αναγνωρίζει και συνδέει αφενός την πρωτεΐνη στόχο (S) και αφετέρου το ένζυμο E2(Ub). Στη συνέχεια, το E3 καταλύει τη μεταφορά της Ub από το E2 στην πρωτεΐνη στόχο, όπου συνδέεται μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυτελικής γλυκίνης 76 (Gly76) της ουβικουτίνης και μιας λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου.



ligase, ligation: σύνδεση) αναγνωρίζει με εξειδίκευση την πρωτεΐνη στόχο (υπόστρωμα) και είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία του συμπλόκου E2-Ub / E3 / υπόστρωμα και τη μεταφορά της ουβικουτίνης από το E2 στην πρωτεΐνη στόχο. Η ουβικουτίνη συνδέεται στο υπόστρωμα μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού Gly-Lys μεταξύ του COOH-τελικού άκρου της Gly76 της ουβικουτίνης και της ε-αμινομάδας μιας λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου (**Εικόνα 1.40**). Στον άνθρωπο τα ένζυμα E2 κωδικοποιούνται από περίπου 40 γονίδια, ενώ οι E3 λιγότες κωδικοποιούνται από περισσότερα από 500 γονίδια και είναι οι κύριοι δέκτες των σημάτων εισόδου.

Η ουβικουτίνωση είναι, όπως και η φωσφορυλίωση και η ακετυλίωση, μια αντιστρεπτή διαδικασία καθώς η ουβικουτίνη απομακρύνεται από την πρωτεΐνη στόχο εξαιτίας εξειδικευμένων απο-ουβικουτινασών (DUB). Μια πρωτεΐνη στόχος μπορεί να μονο-ουβικουτινωθεί από ένα μόνο μόριο ουβικουτίνης ή να πολυ-ουβικουτινωθεί από μια πολυμερή ουβικουτινική αλυσίδα (**Εικόνα 1.41**). Η αλυσίδα αυτή αποτελείται από πολλά μονομερή ουβικουτίνης ενωμένα μεταξύ τους με ισοπεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα στην καρβοξυτελική γλυκίνη (Gly76) της μιας ουβικουτίνης και μιας λυσίνης της άλλης ουβικουτίνης. Από τη στιγμή που η ουβικουτίνη έχει 7 διαθέσιμες λυσίνες (K6, K11, K27, K29, K33, K48 και K63), ικανές να δημιουργήσουν ισοπεπτιδικούς δεσμούς (βλ. **Εικόνα 1.39**), δημιουργείται μια μεγάλη ποικιλία γραμμικών και διακλαδισμένων πολυ-ουβικουτινικών αλυσίδων, καθιστώντας την ουβικουτίνωση πιθανώς την πιο ευμετάβλητη διαδικασία της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης.

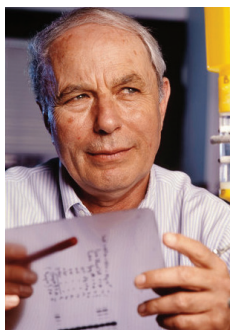
Οι μηχανισμοί του σχηματισμού της ουβικουτινικής αλυσίδας δεν είναι ακόμη γνωστοί, όπως επίσης και το γιατί μια πρωτεΐνη μπορεί να μονο-ουβικουτινωθεί σε μία περίπτωση ή να πολυ-ουβικουτινωθεί σε κάποια άλλη. Πιθανώς κάθε αντίδραση καταλύεται από ένα συγκεκριμένο σύνολο ενζύμων ή η λειτουργία ενός ενζύμου διαμορφώνεται από επιπρόσθετους παράγοντες. Πράγματι, η E3 λιγάση της ουβικουτίνης αλληλεπιδρά με διάφορες ρυθμιστικές υπομονάδες που μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με το εισερχόμενο μήνυμα.

**Εικόνα 1.41**

Πολυ-ουβικουιτίνωση με μια πολυ-ουβικουιτινική “ετικέτα” που οδηγεί την πρωτεΐνη στόχο στα 26S πρωτεασώματα. Το 1ο βήμα είναι η ενεργοποίηση της ουβικουιτίνης από το E1 και η μεταφορά της στο E2. Το 2ο βήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία του συμπλόκου E2-Ub /E3/υποστρώματος (S). Αυτά τα δύο αρχικά βήματα συνεπάγονται τη δημιουργία θειοεστέρων ανάμεσα στις κυστεΐνες των ενεργών κέντρων των E1 και E2 και στο COOH-τελικό άκρο της Gly76 της ουβικουιτίνης. Το 3ο βήμα περιλαμβάνει τη μεταφορά μιας αλυσίδας πολυ-ουβικουιτίνης σε μια λυσίνη της πρωτεΐνης στόχου (υπόστρωμα). Στο 4ο βήμα το πολυ-ουβικουιτινωμένο υπόστρωμα απελευθερώνεται από το E3. Τα πρωτεασώματα αναγνωρίζουν την αλυσίδα πολυ-ουβικουιτίνης ως σήμα απο-ουβικουιτίνωσης και καταστροφής του υποστρώματος. Στο 5ο βήμα, το πρωτεάσωμα απομακρύνει την αλυσίδα πολυ-ουβικουιτίνης και αποπτυνώνει το υπόστρωμα. Η πρωτεΐνη αποικοδομείται στο εσωτερικό του πρωτεασώματος, ενώ τα μόρια ουβικουιτίνης καθώς και τα πεπτίδια που προήλθαν από την πρωτεΐνη ανακυκλώνονται. [14]



Aaron Ciechanover
(1947-)



Avram Hershko
(1937-)



Irwin Rose
(1936-2015)

Τα αποτελέσματα της μονο- και πολυ-ουβικουιτίνωσης είναι διαφορετικά: η μονο-ουβικουιτίνωση επηρεάζει κυρίως διαδικασίες όπως η εσωτερίκευση και η ανακύκλωση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης στόχου (συχνά ενός υποδοχέα), ενώ η πολυ-ουβικουιτίνωση μπορεί να οδηγήσει την πρωτεΐνη στόχο στα πρωτεασώματα για αποικοδόμηση ή να ενεργοποιήσει την ενδοκυτταρική μεταφορά της.

Ένα βραβείο Nobel για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών

Το κύτταρο λειτουργεί ως ένας ιδιαίτερα αποδοτικός σταθμός ελέγχου, όπου οι πρωτεΐνες ζουν ένα ορισμένο χρονικό διάστημα και μετά αποικοδομούνται με έναν έντονο ρυθμό. Η ανακύκλωση των πρωτεϊνών επιτρέπει στο κύτταρο να αντικαθιστά τις ελαττωματικές πρωτεΐνες και να αλλάζει την πρωτεϊνική του σύσταση, ανάλογα με τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Πειράματα από τη δεκαετία 1950 έδειξαν ότι η αποικοδόμηση πρωτεϊνών του κυττάρου απαιτεί ενέργεια. Αυτό δημιουργούσε ερωτηματικά στους ερευνητές και είναι ακριβώς αυτό το παράδοξο που κρύβεται πίσω από το βραβείο Νόμπελ του 2004: ότι σε κάποιες περιπτώσεις η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο απαιτεί ενέργεια, ενώ σε κάποιες άλλες πραγματοποιείται χωρίς πρόσθετη ενέργεια.

Στην περίπτωση που απαιτείται ενέργεια η αποικοδόμηση δεν γίνεται αδιάκριτα, αλλά πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας που κάνει λεπτομερή έλεγχο, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να διασπώνται όταν κάποια στιγμή παραλάβουν μια ειδική μοριακή ετικέτα, μια πολυ-ουβικουιτινική αλυσίδα, κάτι σαν το “φιλί του θανάτου”. Όταν οι πρωτεΐνες ειδοποιούνται με τη σύνδεση αυτών των μορίων για την αποικοδόμησή τους, αποσύρονται σε συγκεκριμένες περιοχές των κυττάρων που περιέχουν κυτταρικά απόβλητα, τα λεγόμενα πρωτεασώματα, όπου εκεί τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια και καταστρέφονται.

Το 2004 οι Aaron Ciechanover, Avram Hershko και Irwin Rose τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Χημείας για την ανακάλυψη “της εξάρτησης της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης από την ουβικουιτίνη”.

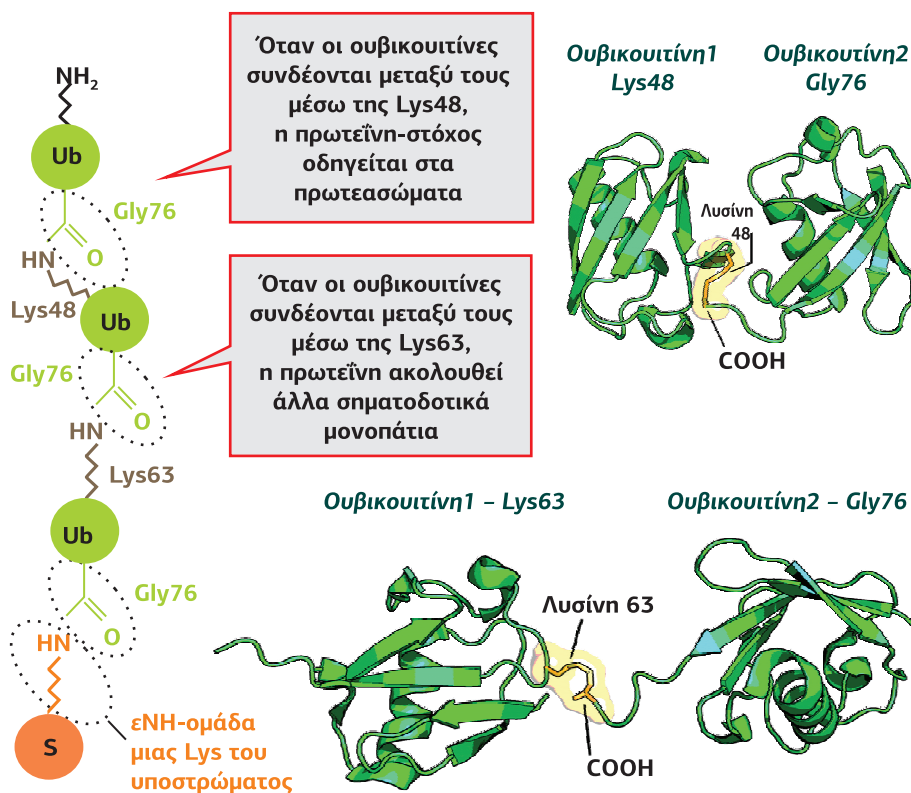
Κυτταρικές λειτουργίες της ουβικουιτίνωσης

Η ουβικουιτίνωση των πρωτεϊνών έχει πολυάριθμες και αντιστρεπτές συνέπειες. Πιο γνωστή είναι η **πρωτεολυτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στα 26S πρωτεασώματα**. Για να οδηγηθούν στα πρωτεασώματα, οι πρωτεΐνες θα πρέπει να σημειωθούν από μια πολυ-ουβικουιτινική “ετικέτα”, η οποία αποτελείται από τουλάχιστον 4 ουβικουιτίνες που συνδέονται μεταξύ τους μέσω της Lys48 της μιας ουβικουιτίνης και της Gly76 της άλλης (**Εικόνα 1.42**).

Στη συνέχεια, οι πολυ-ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες συνδέονται στο πρωτεάσωμα είτε άμεσα σε πρωτεΐνες της 19S υπομονάδας του είτε έμμεσα μέσω πρωτεϊνών προσαρμογής που έχουν τη διπλή ιδιότητα, να αναγνωρίζουν την ουβικουιτινική ετικέτα και να αναγνωρίζονται από το πρωτεάσωμα. Για να εισαχθεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα στο πρωτεάσωμα, θα πρέπει να κοπεί από απο-ουβικουιτινικές πρωτεάσες DUBs (Deubiquitinating enzymes) με εξειδίκευση στη Lys48, που αποτελούν μέρη της 19S ρυθμιστικής υπομονάδας του πρωτεασώματος. Η ουβικουιτινική αλυσίδα που απελευθερώνεται δεν αποικοδομείται περαιτέρω, αλλά ανακυκλώνεται. Μετά την απο-ουβικουιτίνωσή της, η πρωτεΐνη ξεδιπλώνεται από τις πρωτεΐνες AAA+, οι οποίες αποτελούν τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής του πρωτεασώματος και αποικοδομείται (**Εικόνα 1.43**).

Συχνά η αποτελεσματικότητα της πρωτεόλυσης, που επάγεται από την ουβικουιτίνωση, εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση ή άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης υποστρώματος.

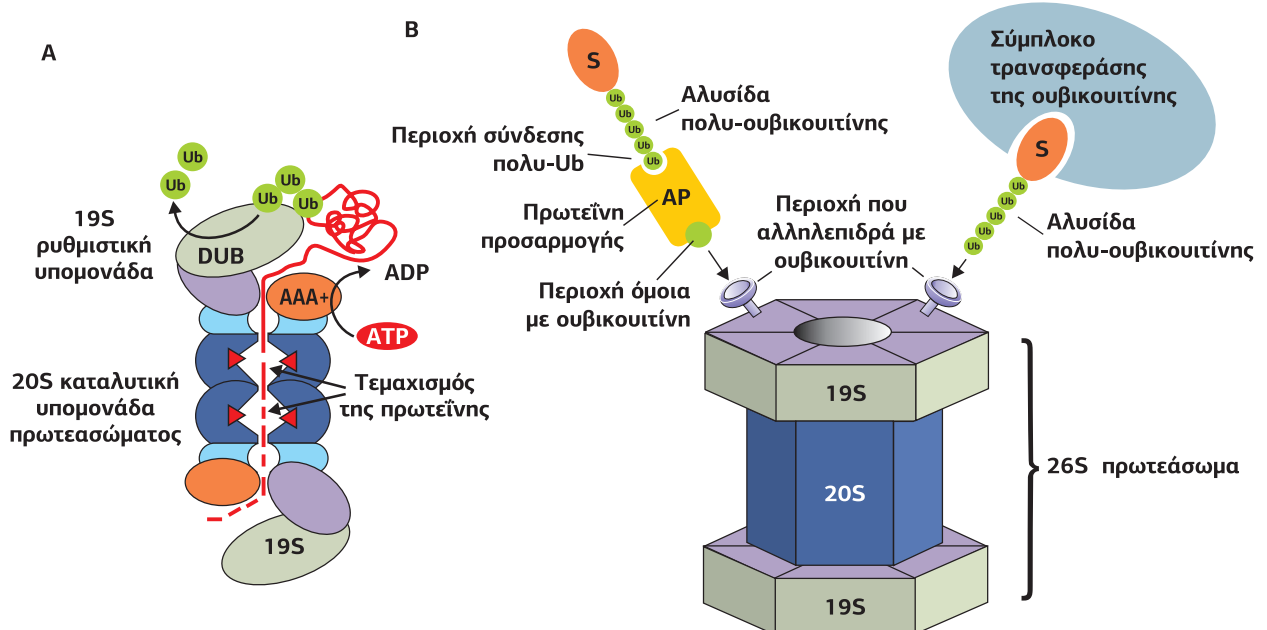
Η πρωτεϊνική αποικοδόμηση με τη μεσολάβηση της ουβικουιτίνης είναι ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα στη διαδικασία σηματοδότησης και συνδέεται τόσο με τη δημιουργία σήματος, απενεργοποιώντας ανασταλτικές πρωτεΐνες, όσο και με την απόσβεση του σήματος. Λόγου χάρι, **μεταγραφικοί παράγοντες** αναγνωρίζονται από λιγάσες ουβικουιτίνης και ουβικουιτινώνονται για γρηγορότερη αποικοδόμη-



Εικόνα 1.42
Η πολυ-ουβικουτινική αλυσίδα καθορίζει την πορεία της πρωτεΐνης στόχου. Η πρωτεΐνη στόχος για να αποικοδομηθεί πρέπει οι ουβικουτίνες να συνδέονται μεταξύ τους μέσω της Lys48-Gly76. Εάν συνδέονται μεταξύ τους μέσω της Lys63-Gly76, η πρωτεΐνη στόχος ακολουθεί άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. [13]

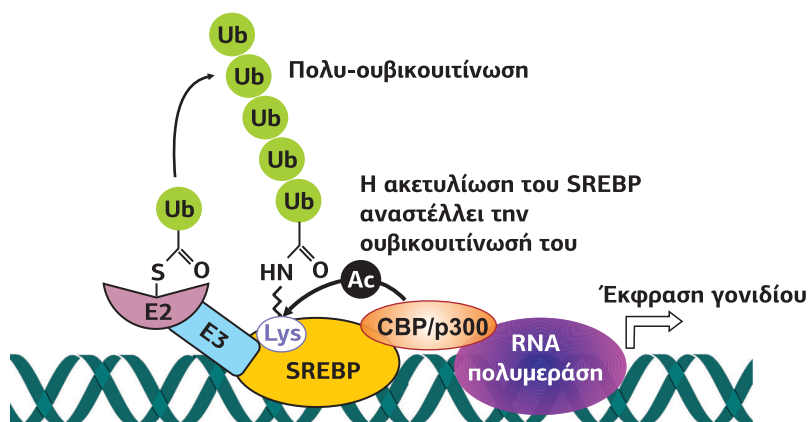
ση (Εικόνα 1.44). Αυτός ο μηχανισμός “αυτοκτονίας” αποτρέπει την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση γονιδίων και με αυτόν τον τρόπο προσαρμόζει τη γονιδιακή έκφραση στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ένα άλλο παράδειγμα δίνεται από τον **κυτταρικό κύκλο**, κάθε φάση του οποίου ελέγχεται από κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDKs, Cyclin-Dependent Kinases). Οι κυκλίνες, οι οποίες είναι οι ρυθμιστικές υπομονάδες των CDKs, παράγονται και αποικοδομούνται με μια αυστηρά καθορισμένη σειρά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη σωστή διαίρεση του κυττάρου. Για την αποικοδόμησή τους οι κυκλίνες θα πρέπει να ουβικουτινω-



Εικόνα 1.44

Ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) ουβικουτινώνεται και αποικοδομείται μέσω μονοπατιού εξαρτώμενου από την ίδια τη μεταγραφική του δραστηριότητα. Η ακετυλοτρανσφεράση CBP/p300 επιτρέπει το ξετύλιγμα του DNA από τις ιστόνες και τη σύνδεση του SREBP οδηγώντας στη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Μετά το τέλος της μεταγραφικής του δραστηριότητας ο SREBP οδηγείται για αποικοδόμηση μέσω ουβικουτινίωσης. Σε ειδικές συνθήκες ο SREBP ακετυλιώνεται από την CBP/p300 σε κατάλοιπα Lys, τα οποία αποτελούν και θέσεις ουβικουτινίωσης, εμποδίζοντας την ουβικουτινίωση και επιμηκύνοντας τη διάρκεια της μεταγραφής. [20]



θούν. Η πολυ-ουβικουτινίωση έχει έναν παρόμοιο ρόλο και στη **διόρθωση του DNA**. Η βλάβη στο DNA οδηγεί στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, για να δώσει στο κύτταρο τη δυνατότητα είτε να επιδιορθώσει τη βλάβη είτε να οδηγηθεί σε απόπτωση. Τα σήματα λήξης περιλαμβάνουν την ουβικουτινινο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση της φωσφατάσης Cdc25 (Cell division cycle 25), η οποία επιτρέπει τη μετάβαση στη φάση της αντιγραφής του DNA.

Σε μια πρωτεΐνη υπόστρωμα πολλά κατάλοιπα Lys μπορούν να μονο-ουβικουτινωθούν. Αυτός ο τύπος της πολλαπλής ουβικουτινίωσης έχει έναν σημαντικό ρόλο στην **ενδοκύτωση**, όπως φαίνεται με παραδειγματικό τρόπο από την down-regulation των μεμβρανικών υποδοχέων, μέσω της οποίας τα κύτταρα προστατεύονται από την υπερδιέγερση. Στη διαδικασία της down-regulation οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς ουβικουτινώνονται και στη συνέχεια συγκεντρώνονται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Αυτά αποκόπτονται από την κυτταρική μεμβράνη, μεταφέροντας το περιεχόμενό τους στα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα, όπου ανακυκλώνονται ή αποικοδομούνται (βλ. **Εικόνα 8.35**).

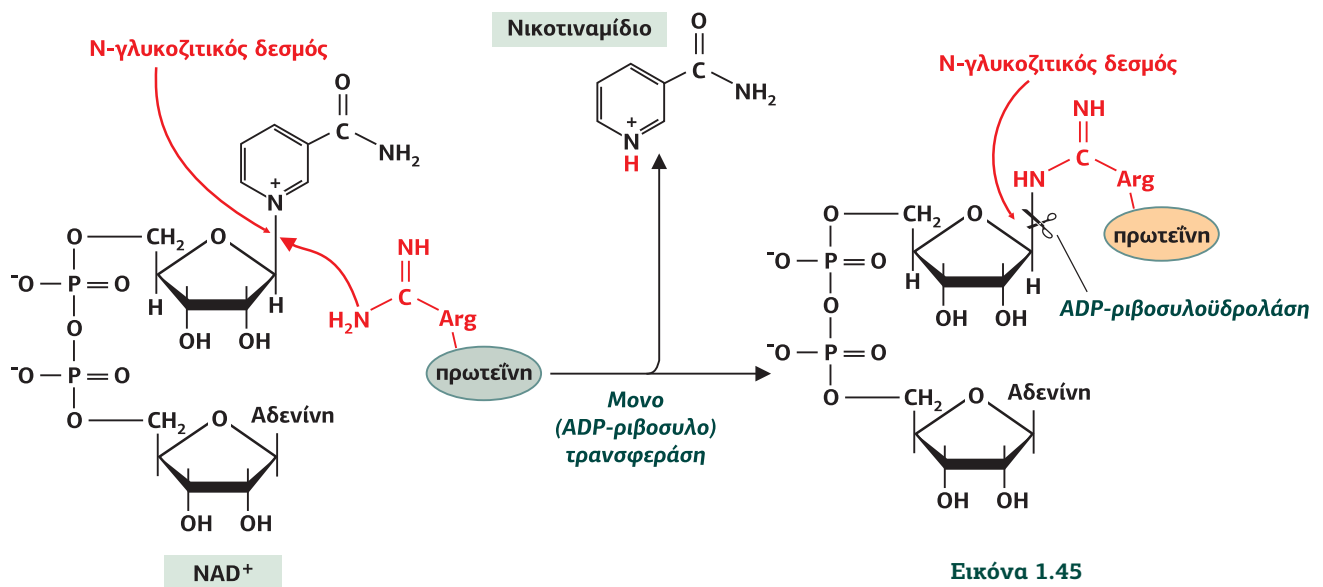
Τερματισμός του σήματος από πρωτεάσες απο-ουβικουτινίωσης

Από τα 561 ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες περίπου 80 κωδικοποιούν ένζυμα απο-ουβικουτινίωσης των πρωτεϊνών, καθιστώντας την ουβικουτινίωση μια αντιστρεπτή διαδικασία. Με περισσότερες από 500 E3 λιγάσες ουβικουτινίωσης, ο “ένζυμικός εξοπλισμός” της ουβικουτινίωσης ανταγωνίζεται αυτόν της φωσφορυλίωσης, ο οποίος στους ανθρώπους αποτελείται από 518 γονίδια κινασών και 120 γονίδια φωσφατάσων. Τα ένζυμα απο-ουβικουτινίωσης (DUBs: deubiquitinating enzymes) συνδέονται με ένα συγκεκριμένο σύνολο υποστρωμάτων, με διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες. Αυτή η εξειδίκευση σχετίζεται με τον τύπο της ουβικουτινικής αλυσίδας, τη θέση που ουβικουτινώνεται και τη φύση της πρωτεΐνης υποστρώματος. Εκτός από τον τερματισμό του σήματος οι DUBs έχουν ως ρόλο να προστατεύσουν τις E3 λιγάσες ουβικουτινίωσης από την αυτο-ουβικουτινίωσή τους. Για αυτούς τους δύο λόγους οι DUBs παρομοιάζονται συχνά με τις λιγάσες.

3.9 | Mono- και πολυ(ADP-ριβοσουλίωση)

Δύο τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων χρησιμοποιούν την ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται από τον μεταβολισμό του NAD⁺ στη μεταγωγή σήματος, η μονο(ADP-ριβοσουλίωση) και η πολυ(ADP-ριβοσουλίωση).

Η **μονο(ADP-ριβοσουλίωση)** αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, στην οποία η ADP-ριβόζη που απελευθερώνεται από το NAD⁺ μεταφέρεται σε μια πρωτεΐνη, όπου συνδέεται με μια αργινίνη με ομοιοπολικό N-γλυκοζιτικό



Εικόνα 1.45

Μono(ADP-ριβουσυλίωση).

Η mono(ADP-ριβουσυλο) τρανσφεράση απομακρύνει το νικοτιναμίδιο από το συνένζυμο NAD⁺ (νικοτιναμίδιο-αδενοδινουκλεοτίδιο) και προσθέτει την ADP-ριβόζη που απομένει σε ένα κατάλοιπο Arg της πρωτεΐνης στόχου. Η υδρόλυση αυτού του δεσμού καταλύεται από μια ADP-ριβουσυλούδρολάση. Και τα δύο ένζυμα ελέγχονται από σήματα εισόδου. Η ενέργεια για το γύρισμα του διακόπτη προέρχεται από την υδρόλυση του N-γλυκοζιτικού δεσμού του NAD⁺. [13]

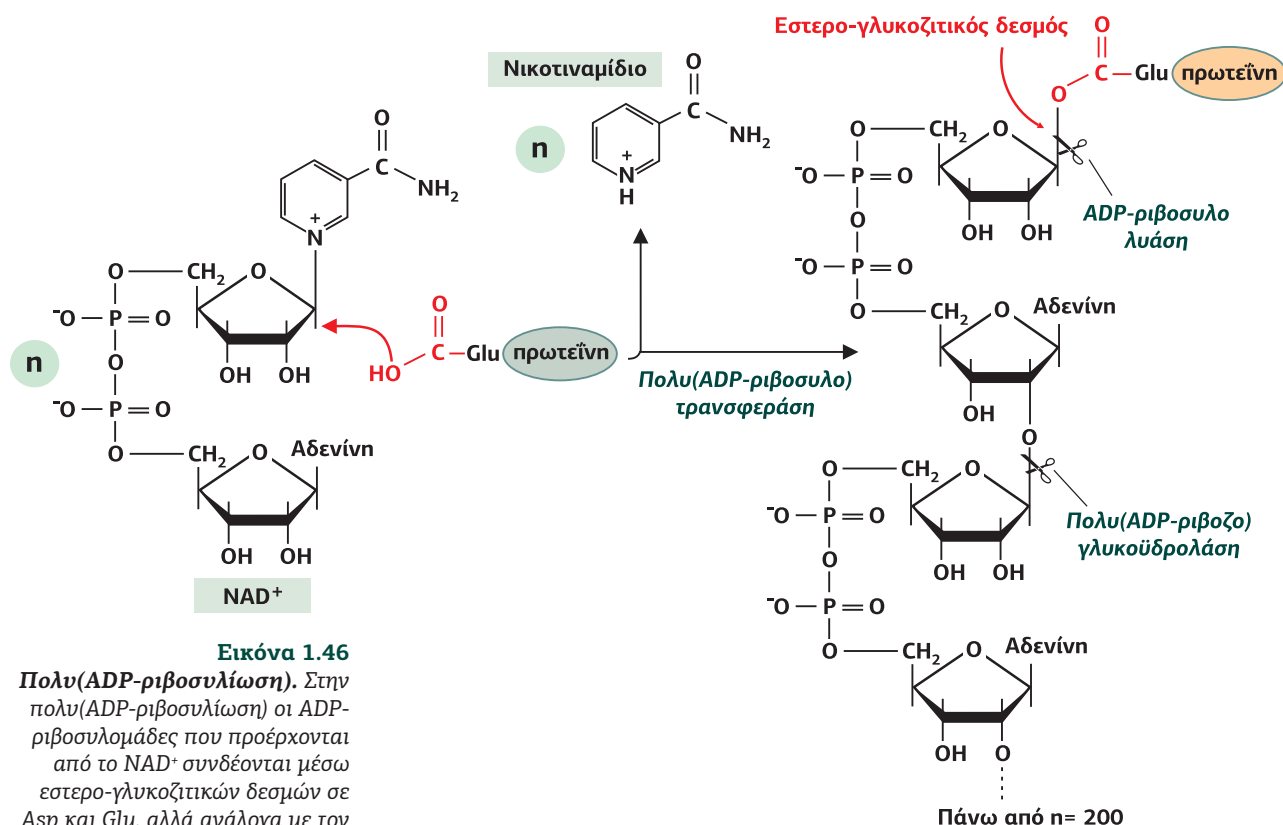
δεσμό (Εικόνα 1.45). Η αντίδραση καταλύεται από τις μονο(ADP-ριβουσυλο) τρανσφεράσες (Mono-ADP ribosyltransferases) και αντιστρέφεται από τις ADP-ριβουσυλούδρολάσες. Αυτά τα ένζυμα έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικούς, ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σε βακτηριοφάγους. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από 200 περίπου γονίδια που αποκτήθηκαν από τα βακτήρια.

Οι ADP-ριβουσυλοτρανσφεράσες ορισμένων **βακτηρίων και ιών** λειτουργούν ως τοξικοί παράγοντες. Για παράδειγμα, οι ADP-ριβουσυλοτρανσφεράσες των βακτηρίων της χολέρας, του κοκίτη και της διφθερίτιδας αποτελούν ισχυρές εξωτοξίνες, αφού καταστρέφουν τον κυτταροσκελετό με ADP-ριβουσυλίωση της ακτίνης ή παρεμβαίνουν στη σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών. Παράδειγμα αποτελεί η υπερενεργοποίηση της μετάδοσης σήματος μέσω της G_s υπομονάδας μετά την ADP-ριβουσυλίωσή της από την τοξίνη της χολέρας και η απενεργοποίηση της G_i υπομονάδας μέσω της ADP-ριβουσυλίωσής της από την τοξίνη του κοκίτη, η οποία επιπλέον αναστέλλει και τη δράση των βγ-υπομονάδων της G-πρωτεΐνης. Μέσω της ADP-ριβουσυλίωσης οι βακτηριοφάγοι επαναπρογραμματίζουν τη βακτηριακή RNA πολυμεράση, έτσι ώστε να μεταγράφει επιλεκτικά ιικά γονίδια. Άλλες βακτηριακές ADP-ριβουσυλοτρανσφεράσες δεν λειτουργούν ως τοξίνες, αλλά ελέγχουν τις μεταβολικές δραστηριότητες ενζύμων, όπως των νιτρογενασών των βακτηρίων του εδάφους.

Οι ADP-ριβουσυλοτρανσφεράσες των **ευκαρυωτών** χωρίζονται σε δύο οικογένειες ενζύμων, τις ενδοκυτταρικές και τις εξωκυτταρικές. Οι εξωκυτταρικές τρανσφεράσες συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI). Βρίσκονται κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και λίγα είναι γνωστά για τον φυσιολογικό τους ρόλο και τις πρωτεΐνες υποστρώματά τους. Οι ενδοκυτταρικές ADP-ριβουσυλοτρανσφεράσες είναι ένζυμα 36 kDa, αποτελούν μέρος του σηματοδοτικού δικτύου και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση ή στην προσωρινή παύση και τον τερματισμό των σημάτων. Η ριβουσυλίωση παίζει επίσης χαρακτηριστικό ρόλο στη μετάδοση του φωτεινού ερεθίσματος στα φωτοευαίσθητα κύτταρα, όπου η πρόσληψη του φωτός ενεργοποιεί τον υποδοχέα ροδοψίνη (GPCR), ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την G-πρωτεΐνη τρανσδουσίση, η α_T-υπομονάδα της οποίας συνδέεται με τη φωσφοδιεστεράση του cGMP (PDE6), επάγοντας την απομάκρυνση της Ργ-ανασταλτικής της υπομονάδας και συνεπώς την ενεργοποίησή της. Η ADP-ριβουσυλίωση της Ργ ανασταλτικής υπομονάδας της φωσφοδιεστεράσης εμποδίζει την απομάκρυνσή της και, κατά συνέπεια, αναστέλλει τη μετάδοση του μηνύματος από την τρανσδουσίση στην PDE6. Επίσης, η ADP-ριβουσυλίωση καταστέλλει τον πολυμερισμό κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, όπως της ακτίνης και της δεσμίνης σε ινίδια, καθώς και τη δραστηριότητα μεταβολικών ενζύμων.

Ο γλυκοζιτικός δεσμός

(ή γλυκοσιδικός) είναι ένας ομοιοπολικός δεσμός που συνδέει ένα σάκχαρο με μια άλλη λειτουργική ομάδα, η οποία μπορεί να ανήκει σε ένα άλλο σάκχαρο ή όχι. Ονομάζεται N-γλυκοζιτικός όταν το OH ενός οποιουδήποτε άνθρακα του σακχάρου αντικαθίσταται από άζωτο (πχ. την NH ομάδα της αργινίνης).



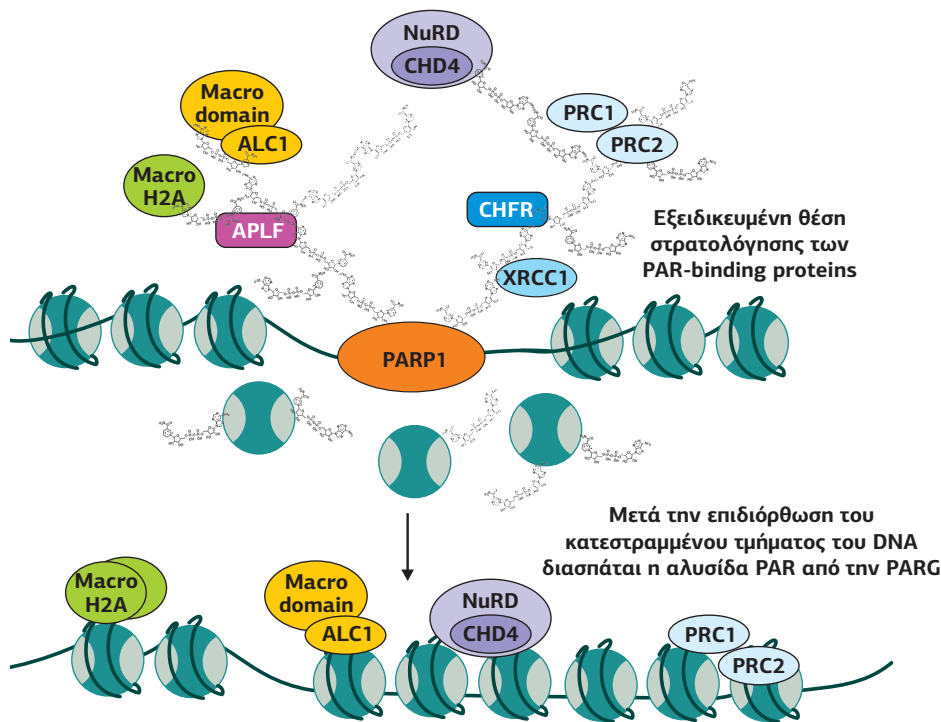
Εικόνα 1.46

Πολυ(ADP-ριβοσυλίωση). Στην πολυ(ADP-ριβοσυλίωση) οι ADP-ριβοσυλομάδες που προέρχονται από το NAD^+ συνδέονται μέσω εστερο-γλυκοζιτικών δεσμών σε Asp και Glu, αλλά ανάλογα με τον υπότυπο της PARP και σε Arg, Lys, His, Cys, Tyr ή Ser της πρωτεΐνης υποστρώματος. Στην αρχική ADP-ριβόζη προστίθενται και άλλες σχηματίζοντας γραμμικές και διακλαδισμένες αλυσίδες άνω των 200 μονάδων. Η πολυ(ADP-ριβοσυλίωση) είναι αντιστρεπτή: η πολυμερής ADP-ριβοσυλο-αλυσίδα αποικοδομείται ταχύτατα από τις πολυ(ADP-ριβοζο)γλυκοϋδρολάσες και η αρχική ομάδα αφαιρείται από την πρωτεΐνη από τις ADP-ριβοσυλολυάσες. [13]

Οι λειτουργίες των PARPs σχετίζονται με τις ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους. Πρόσφατες μελέτες προσδιόρισαν επιπλέον αμινοξέα αποδέκτες της ADP-ριβοσυλίωσης, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού της σειράς ως του κύριου αποδέκτη στα ανθρώπινα κύτταρα και του HPF1 ως του καθοριστικού παράγοντα εξειδίκευσης που επιτρέπει στις PARP1/2 να καταλύουν αυτήν την τροποποίηση. Επιπλέον, οι PARPs μπορούν να τροποποιήσουν όχι μόνο πρωτεΐνες, αλλά και νουκλεϊνικά οξέα.

Η μονο- και πολυ(ADP-ριβοσυλίωση) είναι πρωτεϊνικές τροποποιήσεις με σηματοδοτικό χαρακτήρα που είναι συγγενείς χημικά, αλλά διαφέρουν βιοχημικά. Στην **πολυ(ADP-ριβοσυλίωση)** οι ADP-ριβοσυλομάδες που προέρχονται από το NAD^+ συνδέονται μέσω εστερο-γλυκοζιτικών δεσμών σε κατάλοιπα Asp και Glu, αλλά ανάλογα με τον υπότυπο της PARP και σε Arg, Lys, His, Cys, Tyr ή Ser της πρωτεΐνης υποστρώματος. Στην αρχική ADP-ριβοσυλομάδα προστίθενται και άλλες σχηματίζοντας γραμμικές και διακλαδισμένες αλυσίδες πολυ(ADP-ριβόζης) άνω των 200 μονάδων. Οι **πολυ(ADP-ριβοζο)πολυμεράσες** [PARPs, Poly-(ADP-Ribose) Polymerases] που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις βρίσκονται και σε αρχαία και σε ευκαρυώτες. Όπως και η μονο(ADP-ριβοσυλίωση), η πολυ(ADP-ριβοσυλίωση) είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία: το πολυμερές της ADP-ριβοσυλο-αλυσίδας αποικοδομείται ταχύτατα από τις πολυ(ADP-ριβοζο)γλυκοϋδρολάσες (PARGs), ενώ η αρχική ADP-ριβόζη αφαιρείται από την πρωτεΐνη από τις ADP-ριβοσυλολυάσες (**Εικόνα 1.46**). Οι πρωτεΐνες υποστρώματα των PARPs μπορεί να είναι τα ίδια τα ένζυμα (αυτοτροποποίηση), διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA και ιστόνες.

Η **πολυ(ADP-ριβοσυλίωση) των ιστονών** ανήκει στις αντιδράσεις εκείνες που χρησιμοποιούνται από το κύτταρο για να αλλάξουν τη δομή της χρωματίνης, ώστε να δημιουργηθεί μια πιο χαλαρή δομή, στην οποία θα στρατολογηθούν τα ένζυμα, τα οποία θα επιτρέψουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Επιπλέον, οι εξειδικευμένες DNA-damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerases των ιστονών περιέχουν μια περιοχή σύνδεσης του DNA, η οποία έχει δύο μοτίβα zinc-finger (χαρακτηριστικά πολλών μεταγραφικών παραγόντων). Η περιοχή αυτή αναγνωρίζει και συνδέεται σε κατεστραμμένο DNA, όπως θραύσματα μονόκλωνου DNA, και προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης και ενεργοποίηση της PARP. Η PARP με τη σειρά της ριβοσυλώνει τις ιστόνες καθώς και ένζυμα SSBR (Single Strand Break Repair), τα οποία επιδιορθώνουν τα κατεστραμμένα τμήματα του DNA. Μετά την επιδιόρθωση οι διακλαδισμένες αλυσίδες πολυ(ADP-ριβόζης) καταβολίζονται μέσω της πολυ(ADP-ριβοζο)γλυκοϋδρολάσης (PARG) (**Εικόνα 1.47**).

**Εικόνα 1.47**

Ειδικές PARPs ανιχνεύουν το κατεστραμμένο DNA. Ως απάντηση σε καταστροφή του DNA ειδικές PARPs (πολυ(ADP-ριβοσυλιώνουν) διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων οι ιστόνες και η XRCC1, μια πρωτεΐνη σκαλωσιά, η οποία προσελκύει και συνδέει πρωτεΐνες υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA. Μετά την επιδιόρθωση οι διακλαδισμένες αλυσίδες πολυ(ADP-ριβοζής) καταβολίζονται μέσω της πολυ(ADP-ριβοζο) γλυκουδρολάσης (PARG).

XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 1) συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA με βάση την εκτομή, αλληλεπιδρώντας με την DNA-λιγάση, την πολυμεράση β και την PARP.

PRC1/2 (Polycomb Repressive Complex) μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών σηματοδοτούν μια μεταγραφικά σιωπηλή "silent" χρωματίνη.

CHD4 (Chromodomain Helicase-DNA binding protein) κύριο συστατικό του συμπλόκου **NuRD** (Nucleosome Remodeling Deacetylase) μια απακετυλάση που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και καταστέλλει τη μεταγραφή.

CHFR (Checkpoint with FHA and RING finger domains) μια E3 λιγάση της ουβικουτίνης, η οποία αναστέλλει το πέρασμα από τη φάση G2 στη μίτωση.

ALC1 (Amplified in Liver Cancer 1) απαντά στην καταστροφή του DNA και φέρνει σε επαφή DNA-repair factors και πολυ (ADP-ριβοσυλο) τρανσφεράσες σε θέσεις κατεστραμμένου DNA.

APLF (Aprataxin and PNK-like factor) μια νουκλεάση που συνδέεται σε περιοχές βλάβης του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων με πολυ(ADP-ριβοζή), για την επιτάχυνση αντιδράσεων επιδιόρθωσης της θραύσης κλώνου DNA.

Macro H2A είναι ένα εναλλακτικό μετάγραφο της ιστόνης H2A που διατηρεί μεταγραφικά ανενεργή τη χρωματίνη. [3]

3.10

Το δυναμικό της μεμβράνης: μια πλούσια πηγή ενέργειας για τις κυτταρικές διαδικασίες

Ως δυναμικό μεμβράνης ή δυναμικό ηρεμίας (resting membrane potential) ορίζεται η διαφορά δυναμικού που δημιουργείται από την άνιση κατανομή των ιόντων νατρίου, καλίου, ασβεστίου και χλωρίου εκατέρωθεν της μεμβράνης. Αυτός ο "πυκνωτής" μπορεί να εκφορτιστεί και η ενέργειά του να χρησιμοποιηθεί για τη μεταγωγή σήματος και να επαναφορτιστεί με την παροχή μεταβολικής ενέργειας. Με άλλα λόγια, οι κυτταρικές μεμβράνες δρουν ως ηλεκτρικές μπαταρίες, οι οποίες τροφοδοτούν έναν υπολογιστή. Το μεμβρανικό δυναμικό είναι μια σημαντική πηγή ενέργειας για τη σηματοδοτική διαδικασία, αντάξια της υδρόλυσης των νουκλεοτιδίων σε ενέργεια δεσμών των NTPs (ATP, GTP), του ακετυλο-CoA και του NAD⁺.

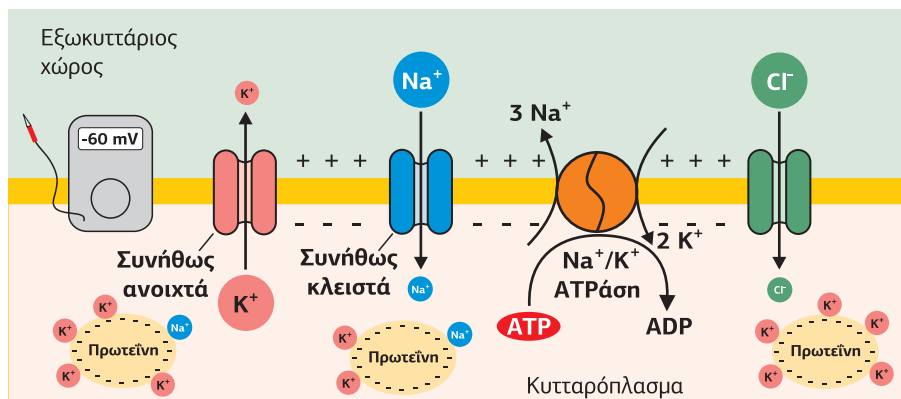
Το κλειδί για να κατανοήσουμε το δυναμικό της μεμβράνης είναι η **ημι-διαπερατότητα των βιομεμβρανών**. Σε υδατικό διάλυμα κάθε ιόν συνδέει ηλεκτροστατικά πολλά μόρια H₂O. Για αυτά τα ενυδατωμένα ιόντα η λιπιδική διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών αποτελεί έναν φραγμό, τον οποίο δεν μπορούν να διασχίσουν ακόμη και κάτω από ακραίες διαβαθμίσεις συγκέντρωσης και φορτίου. Χάρη στα συμπλέγματα πρωτεϊνών που λειτουργούν ως κανάλια ιόντων οι κυτταρικές μεμβράνες καθίστανται διαπερατές στα ιόντα. Ωστόσο, τα κανάλια επιτρέπουν τη μετακίνηση μόνο ιόντων, ενώ μεγαλύτερα φορτισμένα μόρια, όπως αμινοξέα, νουκλεοτίδια, καθώς και ηλεκτρικά φορτισμένα μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα, δεν μπορούν να περάσουν. Αυτή η ημι-διαπερατότητα οδηγεί σε μια άνιση κατανομή του φορτίου.

Για να γίνει πιο ξεκάθαρο, θα μπορούσε κανείς να φανταστεί ένα κύτταρο γεμάτο με διάλυμα ιόντων K⁺ 100mM και κανάλια ιόντων K⁺ στη μεμβράνη του. Αρχικά το θετικό φορτίο εξισορροπείται από αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια, καθιστώντας ουδέτερο το εσωτερικό του κυττάρου. Όταν αυτό το κύτταρο τοποθετηθεί σε ένα υδατικό διάλυμα, τα K⁺ μετακινούνται προς τον εξωκυττάριο χώρο, διαμέσου των καναλιών K⁺ σύμφωνα με τη βαθμίδωση της συγκέντρωσης, ενώ τα αρνητικά

Εικόνα 1.48

Το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης από -50 έως -90 mV αποτελεί πηγή ενέργειας για το κύτταρο. Το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης είναι το αποτέλεσμα τριών παραγόντων:

1. της δράσης της αντλίας Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης, η οποία χρησιμοποιώντας την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP βγάζει 3 Na^+ και βάζει 2 K^+ στο κύτταρο,
2. της παρουσίας δεσμευμένων ανιόντων σε πρωτεΐνες και οργανοφωσφορικά, τα οποία δεν μπορούν να εγκαταλείψουν το κυτταρόπλασμα και 3. της διαφορετικής διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης στα διάφορα ιόντα, καθώς ειδικά κανάλια K^+ παραμένουν συνεχώς ανοικτά, καθιστώντας τα κύτταρα πιο διαπερατά στα ιόντα K^+ .



φορτισμένα μακρομόρια δεν μπορούν να εγκαταλείψουν το κύτταρο. Ως αποτέλεσμα δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης (αρνητικό φορτίο εσωτερικά και θετικό φορτίο εξωκυτταρικά), η οποία σταματά την έξοδο των ιόντων K^+ όταν η ηλεκτροστατική ισχύς (λόγω διαφοράς φορτίου) εξισορροπεί τη χημική ισχύ (λόγω διαφοράς συγκέντρωσης) των ιόντων.

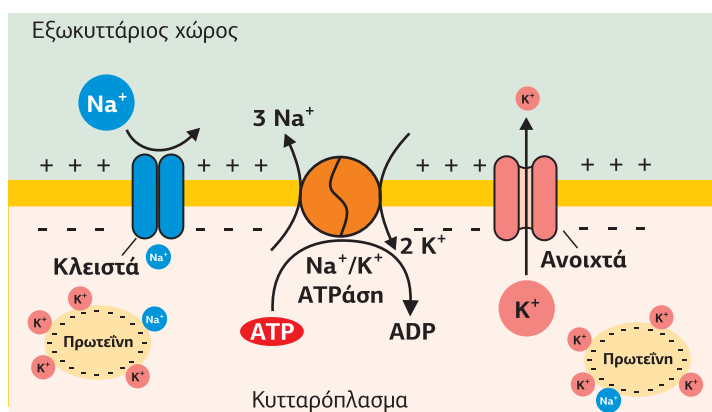
Καθώς σε φυσιολογικές συνθήκες το κύτταρο περιέχει και άλλους τύπους ιόντων και τα αντίστοιχα κανάλια τους, η κατανομή ιόντων που αποκαθίσταται εξωκυτταρικά/ενδοκυτταρικά είναι: K^+ 20:1, Na^+ 1:7 και Cl^- 1:25. Το δυναμικό μεμβράνης που προκύπτει είναι περίπου -20 mV. Παρά την ύπαρξη αυτού του φορτίου, μια καθαρή μετακίνηση ιόντων είναι αδύνατη, καθώς το σύστημα είναι σε ισορροπία. Με άλλα λόγια, κάτω από αυτές τις συνθήκες το δυναμικό της μεμβράνης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τροφοδότης ενέργειας για τη μεταγωγή σήματος ή για άλλες διεργασίες. Εκτός από αυτό, η μεγάλη διαφορά ωσμωτικής πίεσης θα μπορούσε να προκαλέσει είσοδο H_2O (από πόρους της μεμβράνης, υδατοπορίνες) και λύση του κυττάρου.

Για να το εμποδίσει αυτό, το κύτταρο εγκαθιστά μια έλλειψη ισορροπίας στην κατανομή των ιόντων, πλησιάζοντας την αναλογία ενδοκυτταρικά/εξωκυτταρικά στο K^+ 20:1, στο Na^+ 1:7 και στο Cl^- 1:25. Ως αποτέλεσμα η μεμβράνη αποκτά ένα δυναμικό από -50 έως -90 mV, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τροφοδότης ενέργειας. Αυτή η διαφορά δυναμικού δημιουργείται από την ενέργεια που παρέχει η υδρόλυση του ATP που καθοδηγεί ένα σύστημα μεταφοράς ιόντων, την Na^+/K^+ -ΑΤΡάση, η οποία για κάθε μόριο ATP που υδrolύει βγάζει 3 ιόντα Na^+ και βάζει 2 ιόντα K^+ , με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός θετικού φορτίου κάθε φορά από το κύτταρο. Επιπλέον, κάποιοι (όχι όλοι) οι τύποι κυττάρων έχουν αντλίες ιόντων Cl^- για να ρυθμίσουν το δυναμικό της μεμβράνης, ενώ οι Ca^{2+} -εξαρτώμενες ΑΤΡάσες ή οι αντλίες ιόντων Ca^{2+} παίζουν ελάχιστο ρόλο στη ρύθμιση του φορτίου λόγω της μικρής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} (**Εικόνα 1.48**).

Για να διατηρήσουν το δυναμικό της μεμβράνης, οι αντλίες ιόντων πρέπει να δουλεύουν συνεχώς, καθώς το εσωτερικό του κυττάρου εμφανίζει έλλειψη ιόντων

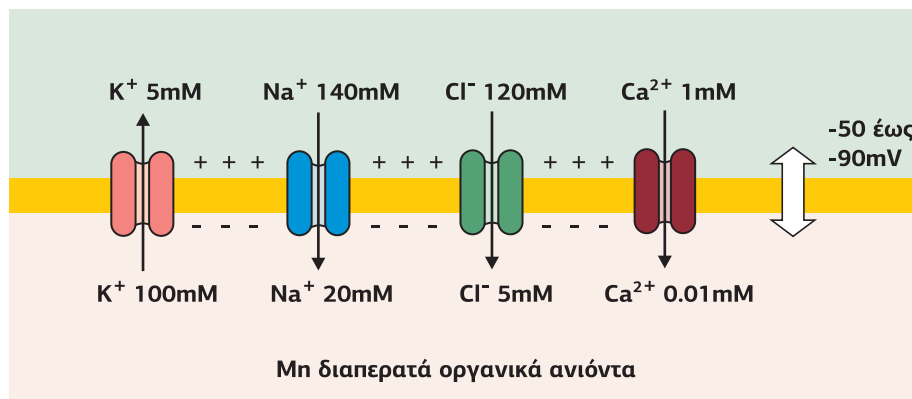
Εικόνα 1.49

Για να διατηρήσουν το δυναμικό ηρεμίας στα -50 με -90 mV, οι αντλίες Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης πρέπει να λειτουργούν συνεχώς λόγω κυτταροπλασματικής έλλειψης K^+ , καθώς συγκεκριμένοι τύποι καναλιών K^+ είναι συνεχώς ανοικτοί.



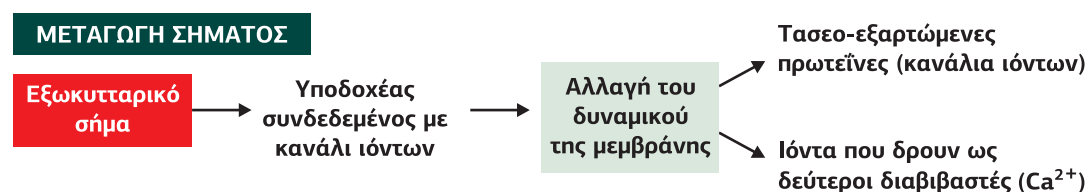
K^+ γιατί συγκεκριμένοι τύποι καναλιών K^+ (κανάλια 2-P-βρόχων, βλ. σσ. 181-182) παραμένουν συνεχώς ανοικτοί (Εικόνα 1.49). Επομένως, αναστολείς της Na^+/K^+ - ΑΤΡάσης, όπως τα ενεργά συστατικά της *Digitalis purpurea*, μπορούν να διαταράξουν το δυναμικό της μεμβράνης “παραλύοντας” το κύτταρο.

Το κύτταρο, ελέγχοντας τη δραστηριότητα των αντλιών ιόντων, μπορεί να μεταβάλει εξειδικευμένα το δυναμικό της μεμβράνης. Σε αυτό το αποτέλεσμα καταλήγει επίσης ελέγχοντας το άνοιγμα των καναλιών, οδηγώντας σε είσοδο ή έξοδο ιόντων ανάλογα με τη βαθμίδωση συγκέντρωσης και φορτίου. Κατά κανόνα, το δυναμικό της μεμβράνης γίνεται πιο αρνητικό με το άνοιγμα καναλιών K^+ , ένα φαινόμενο που ονομάζεται **υπερπόλωση**. Το άνοιγμα των καναλιών Na^+ έχει το αντίθετο αποτέλεσμα: επειδή τα ιόντα Na^+ εισέρχονται στο κύτταρο σύμφωνα με τη βαθμίδωση της συγκέντρωσης, το εσωτερικό του κυττάρου γίνεται λιγότερο αρνητικό, ένα φαινόμενο που ονομάζεται **εκπόλωση**. Αντιθέτως με τα κανάλια Na^+ , τα κανάλια Cl^- μπορούν είτε να υπερπολώσουν είτε να εκπολώσουν το κύτταρο ανάλογα με τη συγκέντρωση του Cl^- και το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Συνεπώς, ο ρόλος των καναλιών Cl^- εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και το φυσιολογικό περιβάλλον (Εικόνα 1.50). Υπάρχουν πολλοί τύποι καναλιών ιόντων, τα οποία ελέγχονται είτε από την αλλαγή τάσης (τασσο-εξαρτώμενα) είτε από τη σύνδεση ενός προσδέτη (προσδετο-εξαρτώμενα).



Εικόνα 1.50

Το δυναμικό της μεμβράνης ως πηγή ενέργειας για τις αντιδράσεις μεταγωγής σήματος. Κατανομή των ιόντων εκατέρωθεν της πλάσματικής μεμβράνης και το δυναμικό ηρεμίας που δημιουργείται. Σήματα μεταβάλλουν την κατανομή των ιόντων ελέγχοντας τα κανάλια ιόντων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει είτε σε μια αύξηση του αρνητικού δυναμικού της μεμβράνης (υπερπόλωση) είτε σε μια μείωση (εκπόλωση). Η προκύπτουσα αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης αναγνωρίζεται ως σήμα από τασσο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες, κυρίως κανάλια ιόντων. Σε αντίθεση με τα ιόντα K^+ , Na^+ και Cl^- , η είσοδος των ιόντων Ca^{2+} στο κύτταρο, μέσω των καναλιών Ca^{2+} , δεν επηρεάζει το δυναμικό της μεμβράνης, αλλά δρα ως δεύτερος διαβιβαστής. Μετά την οποιαδήποτε μεταβολή δυναμικού (είτε εκπόλωση είτε υπερπόλωση) το δυναμικό της μεμβράνης επανέρχεται στο δυναμικό ηρεμίας. [13]



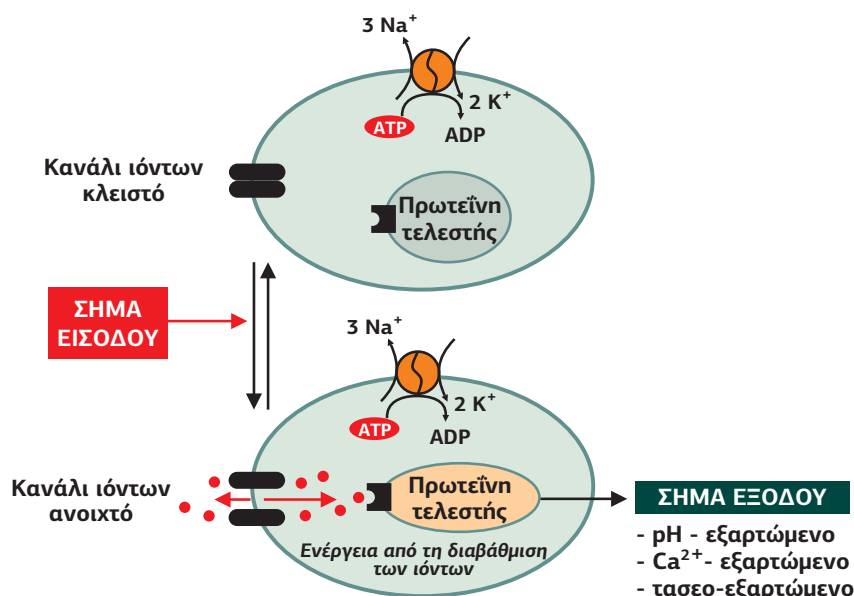
Κανάλια ιόντων

Τα κανάλια ιόντων αποτελούνται από πρωτεΐνες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας έναν διαπερατό πόρο που καλύπτεται από υδρόφιλα αμινοξέα. Γι' αυτόν τον σκοπό απαιτούνται τουλάχιστον 4x2 διαμεμβρανικές περιοχές διευθετημένες κυκλικά. Αυτές οι διαμεμβρανικές περιοχές, κυρίως α-έλικες, είναι τμήματα είτε μίας είτε περισσοτέρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Για να ανοίξει ο πόρος (gate) -μια διαδικασία που ονομάζεται gating- πρέπει να αλλάξει η διαμόρφωση των διαμεμβρανικών περιοχών.

Χάρη στην ύπαρξη των καναλιών ιόντων, τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ενέργεια, η οποία βρίσκεται αποθηκευμένη στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης στις βιοχημικές αντιδράσεις μεταγωγής του σήματος, συνδέοντας την είσοδο ή έξοδο ιόντων μέσω εξειδικευμένων καναλιών με τις σηματοδοτικές διαδικασίες. Στην απλοποιημένη μορφή του ένα κανάλι ιόντων μοιάζει με έναν διακόπτη,

Εικόνα 1.51**Κανάλια ιόντων ως διακόπτες.**

Ένα σήμα (ένας χημικός προσδέτης ή μια αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης) ελέγχει το άνοιγμα της πύλης ενός καναλιού ιόντων. Η αλλαγή στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων που προκύπτει επάγει μια αλλαγή στη διαμόρφωση και τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης τελεστή, δημιουργώντας το σήμα εξόδου. Ανάλογα με τον τύπο του ιόντος το σήμα εξόδου θα μπορούσε να έχει pH-εξαρτώμενα αποτελέσματα, άμεση ρύθμιση της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης (κυρίως από ιόντα Ca^{2+}) και τασσο-εξαρτώμενες μεταβολές. Την ενέργεια που απαιτείται για τη σηματοδότηση την προμηθεύει η διαφορά δυναμικού της μεμβράνης. Αυτή η μπαταρία επαναφορτίζεται από ATP-εξαρτώμενες αντλίες ιόντων. [13]



ο οποίος μπορεί να βρίσκεται είτε σε κλειστή (OFF) είτε σε ανοιχτή (ON) κατάσταση. Ανάλογα με το σήμα εισόδου τα κανάλια ιόντων μπορούν να διακριθούν σε τασσο-εξαρτώμενα και προσδετο-εξαρτώμενα. Τα τασσο-εξαρτώμενα περιέχουν διαμεμβρανικές περιοχές που δρουν ως αισθητήρες τάσης, καθώς η διαμόρφωση και το άνοιγμά τους επηρεάζεται από αλλαγές του δυναμικού της μεμβράνης. Τα προσδετο-εξαρτώμενα κανάλια περιέχουν θέσεις σύνδεσης για εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια, η σύνδεση των οποίων προκαλεί το άνοιγμα του πόρου του καναλιού. Ορισμένα κανάλια ιόντων μπορεί να είναι ταυτόχρονα τασσο-και προσδετο-εξαρτώμενα. Επίσης, ένας ξεχωριστός τύπος καναλιών ιόντων που απαντά στην πίεση είναι τα μηχανο-εξαρτώμενα κανάλια (**Εικόνα 1.51**).

Ωστόσο, στην πραγματικότητα το άνοιγμα ενός καναλιού εκτός από το σήμα εισόδου ελέγχεται από έναν “εσωτερικό χρονοδιακόπτη” και έναν μεγάλο αριθμό από συμπληρωματικούς αλληλεπιδρώντες διακόπτες. Επιπλέον, πολλά κανάλια περιέχουν, από την κατασκευή τους, έναν εσωτερικό διακόπτη που γυρίζει το κανάλι σε μια απευαισθητοποιημένη κατάσταση έπειτα από παρατεταμένη ενεργοποίηση.

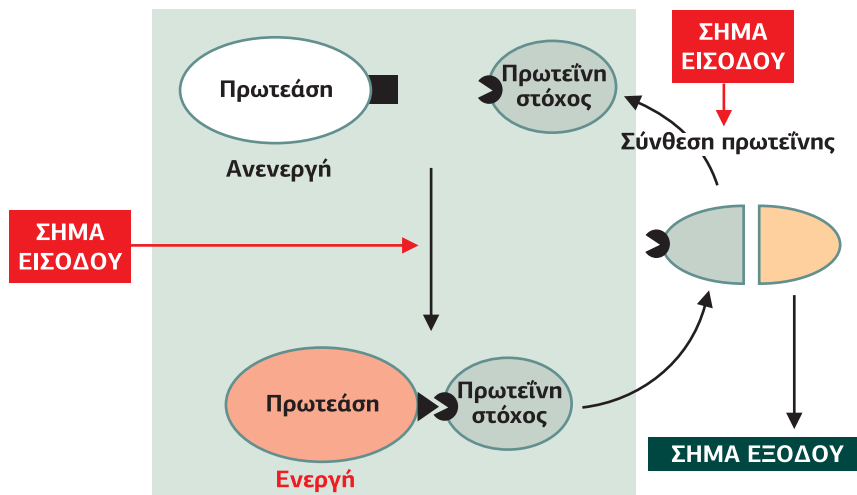
3.11

Η πρωτεόλυση ως διακόπτης: η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών παρέχει χημικούς διαβιβαστές και ενέργεια

Η ενέργεια που απαιτείται για την κυτταρική σηματοδότηση παρέχεται όχι μόνο από την υδρόλυση των πλούσιων σε ενέργεια μεταβολιτών και από το δυναμικό της μεμβράνης, αλλά σε ειδικές περιπτώσεις προέρχεται από την υδρολυτική αποικοδόμηση μακρομορίων και ιδιαίτερα πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η αλληλουχία πρωτεολυτικών αντιδράσεων που ρυθμίζουν τη θρόμβωση του αίματος, η μη ειδική άμυνα (σύστημα του συμπληρώματος) και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση).

Η πρωτεόλυση, εκτός από την ενέργεια που παρέχει, απελευθερώνει και ένα λειτουργικά ενεργό τμήμα της αντίστοιχης πρωτεΐνης (**Εικόνα 1.52**). Χαρακτηριστικό παράδειγμα η σηματοδότηση τύπου Notch: κατά την πρωτεόλυση του διαμεμβρανικού υποδοχέα Notch απελευθερώνεται ενδοκυτταρικά ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, που δρα ως δεύτερος διαβιβαστής και παίζει τον ρόλο του σήματος εξόδου.

Βεβαίως η σηματοδότηση μέσω πρωτεόλυσης είναι μια ακραία περίπτωση για να θεωρηθεί αντίδραση διακόπτης, καθώς για να γυρίσει ο διακόπτης πίσω στο OFF απαιτείται μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και πολύς χρόνος για την de novo σύνθεση των πρωτεϊνών.

**Εικόνα 1.52**

Σε ορισμένες περιπτώσεις η αποικοδόμηση πρωτεϊνών, εκτός από την ενέργεια που παρέχει, απελευθερώνει και ένα τμήμα της πρωτεΐνης, που μπορεί να παίξει τον ρόλο διαβιβαστή. [13]

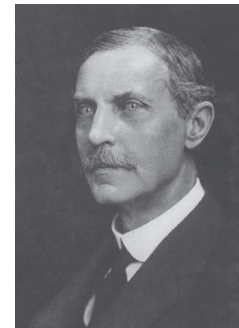
3.12

Υποδοχείς: πώς οι αντιδράσεις που παρέχουν ενέργεια συνδυάζονται με τη μεταγωγή σήματος

Η ύπαρξη των υποδοχέων προτάθηκε στο τέλος του 19ου αιώνα. Ο Άγγλος φυσιολόγος John Newport Langley πρότεινε ότι για να καταστεί δραστική μια φαρμακευτική ουσία πρέπει να συνδεθεί σε μια υποδοκτική ουσία “receptive substance” του οργανισμού. Ενδογενή σήματα, όπως ορμόνες και νευροδιαβιβαστές, δεν ήταν γνωστές. Την ίδια περίοδο ο Paul Ehrlich πρότεινε ότι τα αντιγόνα, αλλά και άλλες ουσίες συνδέονται στην επιφάνεια του κυττάρου σε υποδοχείς, τους οποίους ονόμασε “Seiten ketten” (πλευρικές αλυσίδες), θεωρώντας ότι αναγνωρίζουν το μοριακό σχήμα του προσδέτη σύμφωνα με την αρχή του κλειδιού-κλειδαριάς. Αυτή η αρχή μιας στερεο-εξειδικευμένης δομικής συμπληρωματικότητας είναι ακόμη η βάση της σύγχρονης θεωρίας των υποδοχέων.

Οι υποδοχείς είναι πρωτότυπες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, οι οποίες υπακούουν στους ίδιους κανόνες και νόμους, όπως όλες οι πρωτεΐνες που ανήκουν στα σηματοδοτικά δίκτυα επεξεργασίας πληροφοριών. Για παράδειγμα, υφίστανται αλλοστερική ρύθμιση α. μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, κυρίως με τους προσδέτες τους, και β. μέσω ομοιοπολικών μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα, τον ολιγομερισμό τους και τη σύνδεσή τους με περιοχές αλληλεπίδρασης άλλων πρωτεϊνών. Υπάρχει μόνο μια ιδιότητα που ξεχωρίζει τους υποδοχείς από τις άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες: είναι εξειδικευμένοι στην αναγνώριση εξωκυττάριων σημάτων, τα οποία μπορεί να είναι είτε ενδογενή, όπως ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες κ.λπ. είτε εξωγενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Οι υποδοχείς συνδέουν το περιβάλλον τους με το κυτταρικό δίκτυο επεξεργασίας πληροφοριών, καθώς μεταφράζουν το εξωκυτταρικό σήμα σε μια σειρά ενδοκυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων. Γι’ αυτόν τον λόγο οι υποδοχείς αποτελούνται από μια υψηλά εξειδικευμένη περιοχή αναγνώρισης του σήματος (discriminator domain) και μια περιοχή τελεστή (effector domain). Η αλληλεπίδραση του σήματος με την περιοχή αναγνώρισης είναι πάντα μη ομοιοπολική, συνεπώς πλήρως αντιστρεπτή, και επάγει μια αλλοστερική ενεργοποίηση της περιοχής τελεστή, η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά με άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Παρότι ο υποδοχέας αναγνωρίζει το σήμα εισόδου με υψηλή εξειδίκευση, συνδεδεμένος μαζί του με σχέση κλειδιού-κλειδαριάς, μπορεί να αλληλεπιδρά με διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία πολλές φορές οδηγούν σε αντίθετα αποτελέσματα (Εικόνα 1.53).

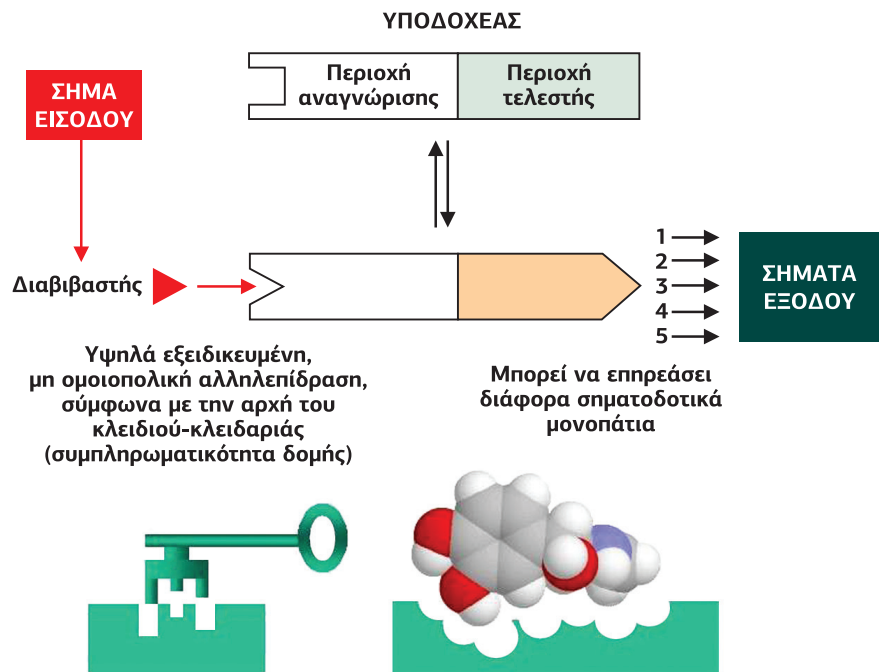
Όπως οποιαδήποτε διαδικασία μεταφοράς σήματος, έτσι και η μεταφορά του σήματος μέσω των υποδοχέων απαιτεί ενέργεια. Για να παραδώσουν το σήμα στο ενδοκυτταρικό δίκτυο επεξεργασίας πληροφοριών, οι υποδοχείς συνδέονται με



John Newport Langley
(1852-1925)

Εικόνα 1.53

Αρχές της λειτουργίας των υποδοχέων. Όπως κάθε σηματοδοτική πρωτεΐνη, οι υποδοχείς αποτελούνται από μια περιοχή αναγνώρισης, που αναγνωρίζει το σήμα εισόδου και συνδέεται μαζί του με μια σχέση κλειδιού-κλειδαριάς, και μια περιοχή τελεστή που δημιουργεί το σήμα εξόδου. Ο υποδοχέας βρίσκεται σε μια αλλοστερική ισορροπία ανάμεσα σε μια ανενεργή και σε μια ενεργή διαμόρφωση. Τα σήματα εισόδου σταθεροποιούν είτε την ανενεργή είτε την ενεργή μορφή, επάγοντας διεγερτικά ή ανασταλτικά αποτελέσματα. [13]



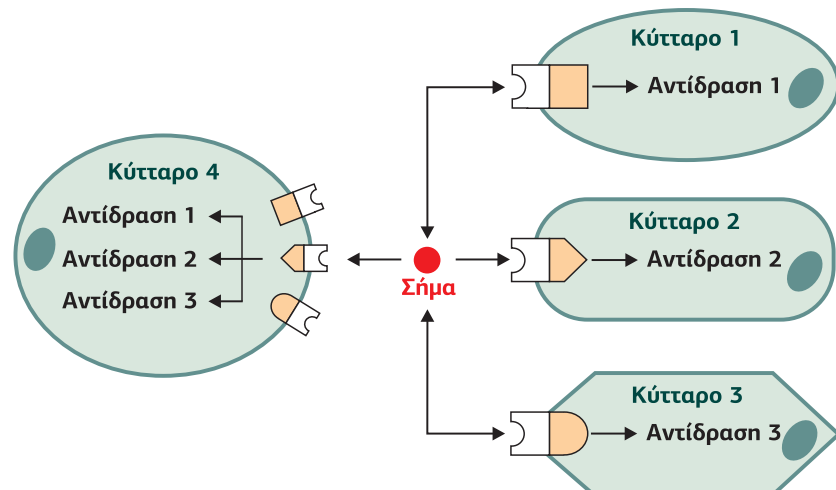
βιοχημικές αντιδράσεις που παρέχουν ενέργεια στις πρωτεΐνες τελεστές, π.χ. με G-πρωτεΐνες που υδrolύουν το GTP ή με κινάσες που υδrolύουν το ATP και μεταφέρουν τη γ-φωσφορική του ομάδα στην πρωτεΐνη στόχο.

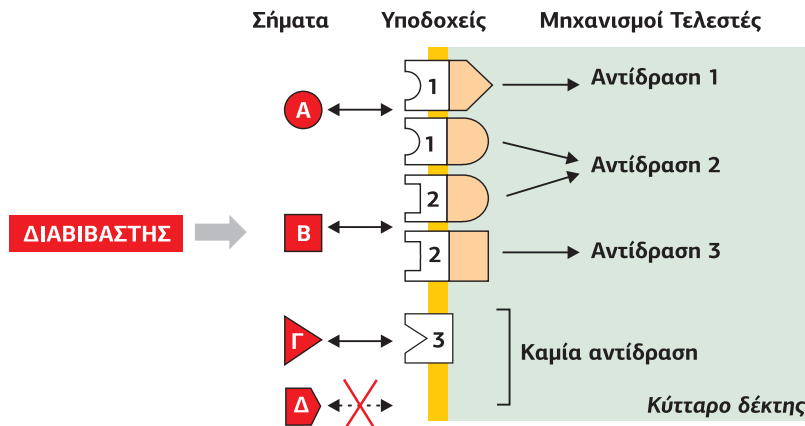
Παρά την εξειδίκευση με την οποία ένας υποδοχέας αναγνωρίζει το σήμα εισόδου, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και το φυσιολογικό πλαίσιο μπορεί να επάγει διαφορετικά αποτελέσματα. Ένα σήμα μπορεί να είναι διφορούμενο, καθώς οι περισσότεροι υποδοχείς υφίστανται σε διαφορετικές ισομορφές, συνδυάζοντας μια σχεδόν όμοια περιοχή διάκρισης του σήματος με διαφορετικές περιοχές τελεστές. Μ' αυτόν τον τρόπο ο ίδιος διαβιβαστής μπορεί να "πυροδοτήσει" διαφορετικές αντιδράσεις σε διαφορετικά είδη κυττάρων (**Εικόνα 1.54**). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα διφορούμενου σήματος είναι η αδρεναλίνη, η οποία μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά αποτελέσματα ενεργοποιώντας διαφορετικούς υποδοχείς. Οι διαφορετικοί αδρενεργικοί υποδοχείς περιέχουν μια θέση σύνδεσης της αδρεναλίνης καλά συντηρημένη και συνδέονται με διαφορετικούς τελεστές, παράγοντας διαφορετικούς δεύτερους διαβιβαστές, όπως είναι το cAMP και η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη (1,4,5 InsP₃).

Επίσης, υποδοχείς που αναγνωρίζουν διαφορετικά σήματα, έχουν δηλαδή διαφο-

Εικόνα 1.54

Διφορούμενα σήματα. Όπως μια κλειδαριά με ένα κλειδί μπορεί να ανοίξει τις πόρτες διαφορετικών δωματίων, ένα σήμα μπορεί να επάγει διαφορετικές αντιδράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (κύτταρα 1, 2 και 3) υπό τον όρο ότι ο υποδοχέας τους θα έχει διαφορετικές περιοχές τελεστές. Υποδοχείς με διαφορετικές περιοχές τελεστές μπορεί να υπάρχουν και στο ίδιο κύτταρο (κύτταρο 4).





ρετικές θέσεις αναγνώρισης του προσδέτη, μπορούν να ενεργοποιήσουν ίδια βιοχημικά σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ίδια βιοχημική απόκριση (Εικόνα 1.55). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου από διαφορετικά είδη υποδοχέων που ενεργοποιούν κοινά ή διαφορετικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν όμως στο ίδιο αποτέλεσμα.

Είδη υποδοχέων

Οι υποδοχείς ανάλογα με το εάν το εξωκυτταρικό σήμα - προσδέτης διαπερνά ή όχι την πλασματική μεμβράνη διακρίνονται στους πυρηνικούς ή κυτταροπλασματικούς υποδοχείς και στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς.

Όταν οι προσδέτες είναι **λιπόφιλοι** και μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη (για παράδειγμα οι στεροειδείς ορμόνες), οι υποδοχείς βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Αποτελούν μια οικογένεια προσδετοεξαρτώμενων πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που λαμβάνουν την ενέργεια για σηματοδότηση από την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το DNA και από την υδρόλυση του ATP από τις πρωτεΐνες συνοδούς. Ωστόσο, άλλοι κυτταροπλασματικοί υποδοχείς, όπως οι διαλυτές γουανυλικές κυκλάσες που συνδέουν NO, δεν λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες.

Όταν οι προσδέτες είναι **υδρόφιλοι** που δεν διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη, οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εκθέτουν την περιοχή διάκρισης-αναγνώρισης του προσδέτη εξωκυτταρικά και την περιοχή τελεστή ενδοκυτταρικά. Η περιοχή τελεστή συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες διακόπτες, όπως GTPάσες, πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφατάσες και κανάλια ιόντων. Οι τρεις σημαντικότερες κατηγορίες διαμεμβρανικών υποδοχέων (Εικόνα 1.56):

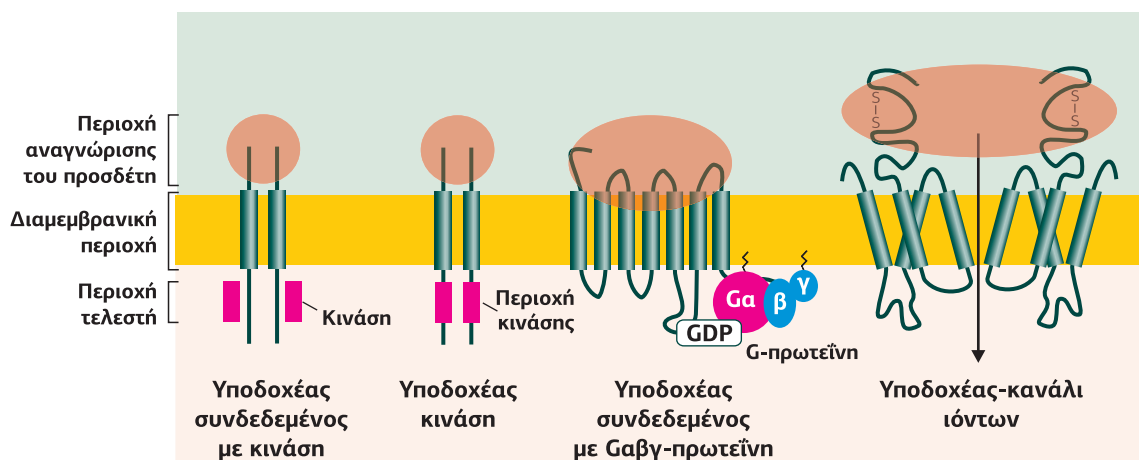
1. **Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες, GPCRs.** Οι GPCRs έχουν μια χαρακτηριστική δομή επτά διαμεμβρανικών περιοχών και ενεργοποιούν μια ετεροτριμερή Gαβγ-πρωτεΐνη. Σε αυτήν την περίπτωση υποδοχέας και G-πρωτεΐνη αποτελούν πάντα ξεχωριστές πρωτεΐνες. Η ενεργή διαμόρφωση, παρουσία GTP, της G-πρωτεΐνης μεταβάλλει τη δραστηριότητα πρωτεϊνών τελεστών μεταφέροντας το μήνυμα. Παρότι το δομικό τους μοντέλο είναι προκαρυωτικής προέλευσης, οι GPCRs συναντώνται μόνο σε ευκαρυώτες και αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια υποδοχέων στα ζώα (όχι στα φυτά).
2. **Υποδοχείς κινάσες ή υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες.** Οι υποδοχείς αυτού του τύπου διαπερνούν μία φορά την πλασματική μεμβράνη και συναντώνται συνήθως ως διμερή, αλλά και ως τετραμερή. Οι υποδοχείς αυτής της κατηγορίας μπορεί να έχουν ενδογενή δράση κινάσης, όπως οι υποδοχείς κινάσες Ser/Thr (π.χ. οι υποδοχείς του TGF-β) και οι υποδοχείς κινάσες Tyr (π.χ. οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων RTKs), ή ο υποδοχέας και η κινάση να είναι ξεχωριστές πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς που συνδέονται με αυτοκινάσες

Εικόνα 1.55

Διαφορετικά είδη υποδοχέων επάγουν την ίδια κυτταρική απόκριση. Παρά το γεγονός ότι η θέση πρόσδεσης-αναγνώρισης του υποδοχέα αναγνωρίζει εξειδικευμένα σήματα, όπως το κλειδί ταιριάζει σε μια κλειδαριά, η περιοχή τελεστή καθορίζει τη βιοχημική αντίδραση του κυττάρου. Ανάλογα με τον τύπο της περιοχής τελεστή του υποδοχέα δύο διαφορετικά σήματα (A ή B) μπορεί να επάγουν διαφορετική αντίδραση το καθένα (1 ή 3) ή μπορούν να επάγουν την ίδια αντίδραση (2). Η περίπτωση 3 αφορά έναν απλό δέκτη (acceptor) και όχι υποδοχέα (receptor), αφού δεν περιέχει περιοχή τελεστή και συνεπώς η σύνδεση του σηματοδοτικού μορίου (Γ) δεν οδηγεί σε φυσιολογικό αποτέλεσμα. Τέλος, όταν για ένα σήμα (Δ) δεν υπάρχει ο αντίστοιχος υποδοχέας στο κύτταρο, επίσης δεν ενεργοποιείται φυσιολογικό αποτέλεσμα.

Ως σήμα (signal) χαρακτηρίζεται ένα εξωγενές (φως, θερμοκρασία, μηχανικό ερέθισμα) ή ενδογενές ερέθισμα - εξωκυτταρικό ή ενδοκυτταρικό, το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαμόρφωση μιας σηματοδοτικής πρωτεΐνης, επηρεάζοντας τη λειτουργία του κυττάρου.

Ο όρος **προσδέτης (ligand)** είναι πιο περιορισμένος καθώς αναφέρεται σε ένα ιόν (Ca^{2+}), μικρό μόριο (αδρεναλίνη, ακετυλοχολίνη, cAMP, IP_3), πεπτίδιο (FSH), λιπίδιο (DAG), ή ένα εξωγενές συνθετικό μόριο, το οποίο είναι ικανό να μεταβάλει τη διαμόρφωση μιας σηματοδοτικής πρωτεΐνης από ON σε OFF ή αντίστροφα.



Εικόνα 1.56
Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες διαμεμβρανικών υποδοχέων. Οι τρεις σημαντικότεροι τύποι διαμεμβρανικών υποδοχέων είναι οι υποδοχείς κινάσες (συνήθως ως διμερή) ή υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες, οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (με 7 διαμεμβρανικές περιοχές και ως περιοχή τελεστής μια συνδεδεμένη ετεροτριμερή Gαβγ πρωτεΐνη) και οι υποδοχείς κανάλια ιόντων. [13]

His και συναντώνται στους προκαρυώτες, και οι υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες Tyr (π.χ. οι υποδοχείς κυτοκινών που συνδέονται με κινάσες Jak) και συναντώνται μόνο σε ζωικά κύτταρα.

3. **Υποδοχείς κανάλια ιόντων.** Πρόκειται για προσδετοεξαρτώμενα κανάλια ιόντων, τα οποία ενεργοποιούνται, ανοίγουν από την πρόσδεση του εξωκυτταρικού διαβιβαστή. Συνήθως αποτελούνται από 4-5 υπομονάδες και έχουν δύο ή περισσότερες θέσεις σύνδεσης του προσδέτη.

Μια ειδική κατηγορία υποδοχέων είναι οι **υποδοχείς γουανυλικές κυκλάσες** (διαμεμβρανικές ή κυτταροπλασματικές), οι οποίες μετά τη σύνδεση του προσδέτη καταλύουν τη σύνθεση του δεύτερου διαβιβαστή cGMP.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 1.500 γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς. Υπολογίζεται ότι οι υποδοχείς καταλαμβάνουν έως και το 25% της επιφάνειας ενός κυττάρου. Θεωρητικά, λοιπόν, ένα κύτταρο θα μπορούσε να εκφράσει στην επιφάνειά του έως 4 εκατομμύρια μόρια υποδοχέων. Από τα 1.500 γονίδια υποδοχέων μόνο ορισμένα εκφράζονται σε έναν συγκεκριμένο ιστό. Ωστόσο, ένα κύτταρο έχει έναν εντυπωσιακά μεγάλο αριθμό πιθανοτήτων να απαντήσει. Ακόμη και αν μόνο το 1% των γονιδίων είναι ενεργό, δηλ. εκφράζονται μόνο 15 είδη υποδοχέων, θα μπορούσε να απαντήσει με πάρα πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς.

4. Εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια: ορμόνες, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες

Τα περισσότερα κύτταρα που στέλνουν ένα ερέθισμα απελευθερώνουν ένα σηματοδοτικό μόριο διαβιβαστή στο εξωκυτταρικό υγρό. Όταν το κύτταρο στόχος είναι μακριά, το σηματοδοτικό μόριο φθάνει στον προορισμό του μέσω του κυκλοφορικού συστήματος και ονομάζεται **ορμόνη**. Στην περίπτωση που οι ορμόνες είναι πρωτεϊνικής φύσεως και ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση ονομάζονται **αυξητικοί παράγοντες**. Οι διαβιβαστές μπορεί να είναι: ορμόνες, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, νευροδιαβιβαστές, το ATP και το cAMP ως εξωκυτταρικά μηνύματα, και φερομόνες.

4.1 | Ορμόνες

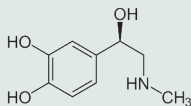
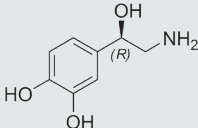
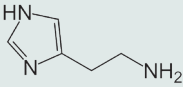
Η λέξη ορμόνη προέρχεται από τη λέξη “ορμή”, θεωρώντας ότι είναι μόρια που κρύβουν μέσα τους μια ορμή, η οποία τα ωθεί να μεταφερθούν από το σημείο όπου παράγονται σε μεγάλες αποστάσεις μέσα στον οργανισμό. Σήμερα ο όρος ορμόνη

χαρακτηρίζει ένα σύνολο χημικών διαβιβαστών πολύ διαφορετικής σύστασης, που έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στον ιστό στόχο (ενδοκρινής σηματοδότηση). Ρόλο ορμονών παίζουν:

- Μικρά υδρόφιλα μόρια παράγωγα αμινοξέων (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, ισταμίνη).
- Υδρόφιλα πεπτίδια και πρωτεΐνες (ινσουλίνη, γλυκαγόνη, TSH, FSH).
- Λιπόφιλα μόρια που διαπερνούν την πλασματική και συνδέονται σε πυρηνικούς υποδοχείς (προγεστερόνη, οιστραδιόλη, τεστοστερόνη, κορτιζόλη, αλδοστερόνη).
- Λιπόφιλα μόρια, παράγωγα του αραχιδονικού, τα οποία παρά τον λιπόφιλο χαρακτήρα τους δεν διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη, αλλά συνδέονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς (προσταγλανδίνες).

Πίνακας 1.3

Οι ορμόνες χαρακτηρίζονται χημικοί διαβιβαστές πολύ διαφορετικής σύστασης που μεταφέρονται μέσω του αίματος στα κύτταρα στόχους τους

α. Υδρόφιλες Ορμόνες που αναγνωρίζονται από μεμβρανικούς υποδοχείς	
α1. Παράγωγα αμινοξέων	Βιοχημική και/ή φυσιολογική δράση
Αδρεναλίνη 	Παράγεται από τον μυελό των επινεφριδίων και απελευθερώνεται σε περιπτώσεις πανικού προκαλώντας σύσπαση των λείων μυών των αγγείων και άρα αύξηση της πίεσης του αίματος, καταβολισμό του γλυκογόνου στο συκώτι, καταβολισμό των λιπιδίων στον λιπώδη ιστό κ.λπ.
Νοραδρεναλίνη 	Παράγεται από τον μυελό των επινεφριδίων και απελευθερώνεται σε περιπτώσεις πανικού, με δράση παρόμοια της αδρεναλίνης.
Ισταμίνη 	Παράγεται από τα σιτευτικά κύτταρα και απελευθερώνεται σε περιπτώσεις φλεγμονής προκαλώντας διαστολή των αιμοφόρων αγγείων.
α2. Πεπτίδια, πρωτεΐνες	Βιοχημική και/ή φυσιολογική δράση
Γλυκαγόνη (29aa)	Παράγεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος και προκαλεί καταβολισμό του γλυκογόνου στο ήπαρ και των λιπιδίων στον λιπώδη ιστό.
Ινσουλίνη (α-αλυσίδα: 21aa, β-αλυσίδα: 30aa)	Παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και προκαλεί πρόσληψη γλυκόζης από τους μυς και τον λιπώδη ιστό, αποθήκευση τριγλυκεριδίων στον λιπώδη ιστό, καταβολισμό υδατανθράκων, σύνθεση γλυκογόνου και αναστολή γλυκονεογένεσης, πρωτεϊνοσύνθεση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
Γαστρίνη (17aa)	Παράγεται από τα G-κύτταρα του στομάχου και προκαλεί έκκριση HCl και πεψίνης.
Σεκρετίνη (27aa)	Παράγεται από τα S-κύτταρα του δωδεκαδακτύλου και εκκρίνεται ως απάντηση σε χαμηλό pH διεγείροντας την έκκριση παγκρεατικών πρωτεασών.
ACTH ή κορτικοτροπίνη (39aa)	Παράγεται από την πρόσθια υπόφυση, διεγείρει την παραγωγή κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων και την απελευθέρωση λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό.
Follicle Stimulating Hormone FSH (α-αλυσίδα: 92aa, β-αλυσίδα: 118aa)	Παράγεται από την πρόσθια υπόφυση και ρυθμίζει την ανάπτυξη των ωοκυττάρων και του ωοθυλακίου στις ωοθήκες, την ωρίμανση κατά την εφηβεία και αναπαραγωγικές διεργασίες.

Thyroid Stimulating Hormone TSH (α-αλυσίδα: 92αα, β-αλυσίδα: 112αα)	Παράγεται από την πρόσθια υπόφυση και προκαλεί απελευθέρωση της θυροξίνης (T_4 ορμόνη) και της τρι-ιωδοθυρονίνης (T_3 ορμόνη) από τον θυρεοειδή αδένα.
--	--

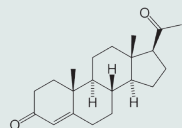
Βασοπρεσίνη ή αντιδιουρητική ορμόνη (9αα)	Παράγεται από την οπίσθια υπόφυση και διεγείρει την επαναρρόφηση νερού από τους νεφρούς, ενώ παράλληλα αυξάνει την αρτηριακή πίεση προκαλώντας αγγειοσυσπασση.
--	--

β. Λιπόφιλες Ορμόνες που αναγνωρίζονται από κυτταροπλασματικούς υποδοχείς

Στεροειδή

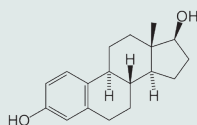
Βιοχημική και/ή φυσιολογική δράση

Προγεστερόνη



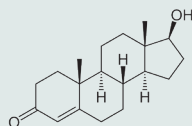
Παράγεται από τα ωάρια και τον πλακούντα και προετοιμάζει τη μήτρα για την εμφύτευση του εμβρύου.

Οιστραδιόλη



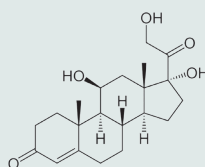
Παράγεται από τα κοκκιώδη κύτταρα του ωοθυλακίου, προετοιμάζει τη μήτρα να δεχθεί τη βλαστοκύστη, υπεύθυνη για την πάχυνση του ενδομητρίου και για την ανάπτυξη δευτερευόντων θηλυκών φυλετικών χαρακτηριστικών (π.χ. των μαστών).

Τεστοστερόνη



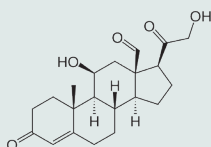
Παράγεται από τους όρχεις και τις ωοθήκες, είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος.

Κορτιζόλη



Παράγεται από τον φλοιό των επινεφριδίων, είναι υπεύθυνη για τον μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών, δρα ως αντιφλεγμονώδες και ανοσοκατασταλτικό.

Αλδοστερόνη



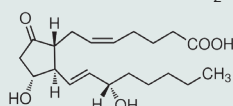
Παράγεται από τον φλοιό των επινεφριδίων και δρα στους νεφρούς επάγοντας την επαναρρόφηση νερού και νατρίου, καθώς και την απέκκριση καλίου. Κατά συνέπεια, αυξάνει την πίεση του αίματος.

γ. Λιπόφιλες Ορμόνες που αναγνωρίζονται από μεμβρανικούς υποδοχείς

Παράγωγα αραχιδονικού οξέος

Βιοχημική και/ή φυσιολογική δράση

Προσταγλανδίνη E_2



Παράγεται από τα περισσότερα είδη κυττάρων και η δράση της είναι συνήθως τοπική: από συσώρευση αιμοπεταλίων έως σύσπασση της μήτρας.

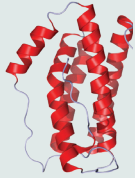
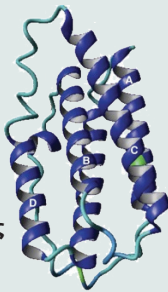
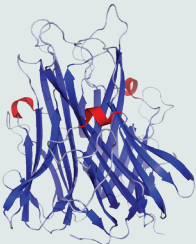
4.2 | Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι μια ομάδα πεπτιδικών μορίων, τα οποία ανακαλύφθηκαν σχετικά πρόσφατα. Παίζουν σημαντικό ρόλο στα κύτταρα και ταξινομούνται χωριστά από τις ορμόνες, γιατί παράγονται από πολλούς τύπους κυττάρων και ασκούν τη δράση τους σε κοντινή απόσταση ή ακόμη και στο ίδιο κύτταρο από το οποίο απελευθερώθηκαν (παρακρινής και αυτοκρινής επικοινωνία).

Στις κυτοκίνες ανήκουν κυρίως οι διαβιβαστές που ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση στα θηλαστικά και περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες (IL-1 έως IL-35), τις ιντερφερόνες και τους παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNFs, Tumor Necrosis Factors). Σήμερα ως κυτοκίνες χαρακτηρίζονται περισσότερα από 80 πεπτίδια.

Πίνακας 1.4

Οι κυτοκίνες είναι τοπικοί διαμεσολαβητές που ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες, τις ιντερλευκίνες, τις ιντερφερόνες και τους παράγοντες νέκρωσης όγκων.

Κυτοκίνες	Πού παράγονται	Δράση	Πώς ανακαλύφθηκαν
IL-6 Ιντερλευκίνες 	Η πλειοψηφία των ιντερλευκινών παράγεται από τα CD4 ⁺ T _H , αλλά και από τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.	Επάγουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T-, B- και των αιμοποιητικών κυττάρων.	Το 1983 απομονώθηκε η ιντερλευκίνη-2, μια γλυκοπρωτεΐνη που προωθούσε τον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων, η ύπαρξη της οποίας είχε προταθεί από το 1965.
IFN-β Ιντερφερόνες 	Οι ιντερφερόνες είναι τύπου I (IFN-α, IFN-β) και τύπου II (IFN-γ). Παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού ως απάντηση σε παθογόνα.	Αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού μέσα στο κύτταρο ξενιστή και ταυτόχρονα επάγουν την απόπτωση του μολυσμένου κυττάρου.	Η ύπαρξη ενός "viral inhibitory factor" στο μέρος του ιστού που ενοφθαλμίστηκε με ανενεργό στέλεχος ιού προτάθηκε το 1954. Το 1957 επαναβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός παράγοντα που μεσολαβεί "interfere" στην αύξηση του ιού της γρίπης έπειτα από ένεση ανενεργού στέλεχους του ιού σε αυγά κοτόπουλου. Ο παράγοντας απομονώθηκε το 1978 και ονομάστηκε ιντερφερόνη-τύπου I.
Tumor Necrosis Factor 	Ο TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) παράγεται από τα μακροφάγα, τα σιτευτικά, τα ενδοθηλιακά, τα καρδιομυοκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα νευρικά κύτταρα.	Επάγει τη φλεγμονή, οδηγεί σε απόπτωση και αναστέλλει την ογκογένεση.	Το 1968 προτάθηκε η ύπαρξη ενός κυτταροτοξικού παράγοντα που παράγεται από τα λεμφοκύτταρα και ονομάστηκε λεμφοτοξίνη. Το 1975 προτάθηκε η ύπαρξη ενός κυτταροτοξικού παράγοντα που παράγεται από τα μακροφάγα και ονομάστηκε TNF. Το 1984 η κλωνοποίηση των δύο παραγόντων έδειξε ομοιότητα και ο TNF ονομάστηκε TNFα και η λεμφοτοξίνη TNFβ.

4.3**Αυξητικοί παράγοντες**

Τον όρο αυξητικός παράγοντας τον χρησιμοποιούμε για να χαρακτηρίσουμε μόρια, τα οποία έχουν ως λειτουργικό ρόλο τη ρύθμιση της αύξησης, της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ωστόσο, εκτός από την ανάπτυξη ο ρόλος τους προεκτείνεται και στη φλεγμονή, την επούλωση τραυμάτων, την ανοσοποιητική επαγρύπνηση και την καρκινογένεση. Για παράδειγμα ο PDGF, που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια σε περιοχές βλάβης του ιστού, δεν στηρίζει μόνο την ανάπτυξη των ινοβλαστών, των λείων μυϊκών κυττάρων και των γλοιοκυττάρων, αλλά επίσης ρυθμίζει την κατανομή και τη μετανάστευση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών στην επούλωση των τραυμάτων.

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι συνήθως είναι μικρά πεπτίδια που δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και προκαλούν τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των κυττάρων στόχων. Σήμερα είναι γνωστοί περισσότεροι από 50 αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης Tyg, που ταξινομούνται σε 20 διαφορετικές οικογένειες. Η ονοματολογία τους είναι αυθαίρετη. Μερικοί αυξητικοί παράγοντες ονομάστηκαν από τα κύτταρα από τα οποία απομονώθηκαν, άλλοι από τα κύτταρα τα οποία ερεθίζουν, άλλοι ακόμη από την αρχική δράση που φαινόταν ότι εκτελούσαν. Ένα καλό παράδειγμα είναι ο TGFβ (Transforming Growth Factor). Όπως υπονοεί το όνομά του εμφανίστηκε σαν ένας

παράγοντας που ενισχύει τον κυτταρικό μετασχηματισμό, αλλά τώρα αναγνωρίζουν ότι μπορεί να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ότι είναι ένας πολύ ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας για τα ουδετερόφιλα και τους ινοβλάστες. Χαρακτηριστικότεροι αυξητικοί παράγοντες είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal Growth Factor), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF, Fibroblast Growth Factor), ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF, Nerve Growth Factor), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor), καθώς επίσης πολλές κυτοκίνες έχουν ρόλο αυξητικού παράγοντα (ιντερλευκίνες, GM-CSF, Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, κ.λπ.). Για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Κεφάλαιο 8, Πίνακας 8.1.

4.4 | Νευροδιαβιβαστές

Οι νευροδιαβιβαστές είναι χημικά μόρια που παράγονται και απελευθερώνονται από νευρώνες και ρυθμίζουν την επικοινωνία ανάμεσα σε νευρικά κύτταρα ή σε νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα στόχους τους (π.χ. νευρικό-μυϊκό, νευρικό-αδένας). Απελευθερώνονται από την προσυναπτική απόληξη στη συναπτική σχισμή. Υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια που πρέπει να πληροί μια ουσία για να θεωρείται νευροδιαβιβαστής (**Εικόνα 1.57**):

Εικόνα 1.57

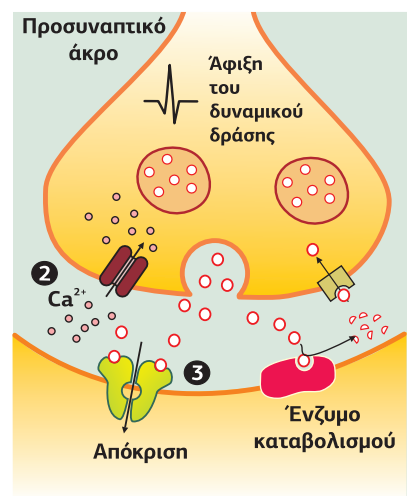
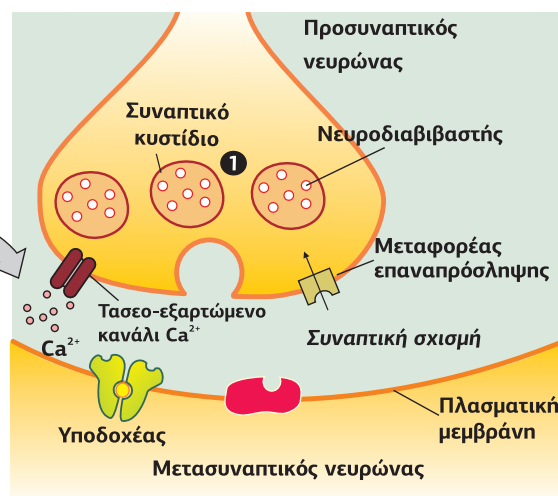
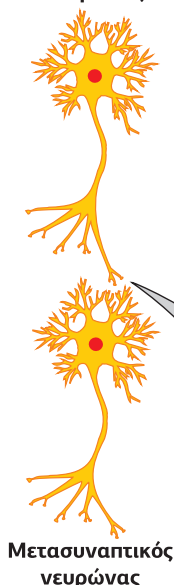
Τα τρία κριτήρια που πρέπει να πληροί μια ουσία για να θεωρείται νευροδιαβιβαστής:

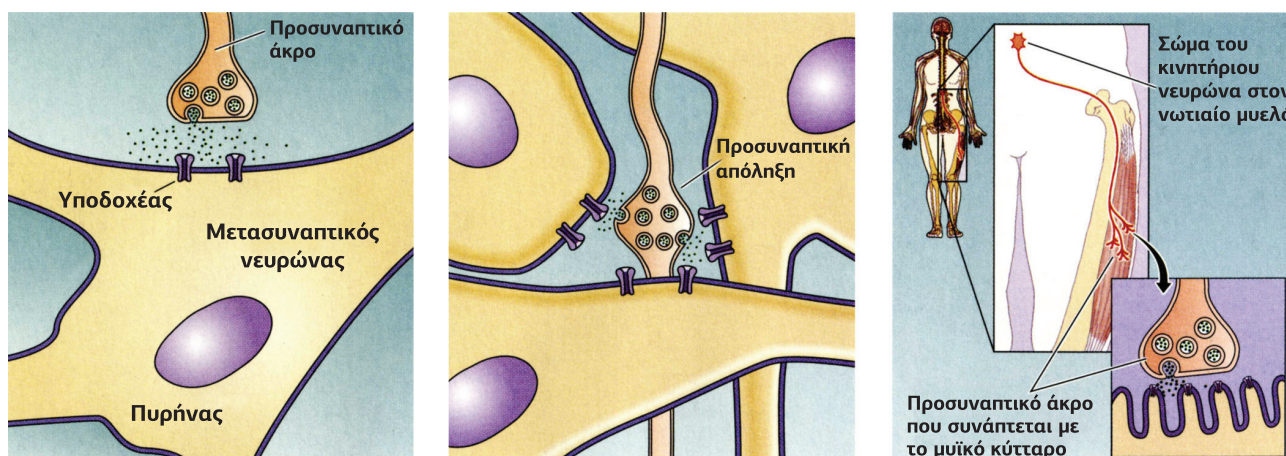
1. Να βρίσκεται μέσα σε κυστίδια στο συναπτικό άκρο ενός νευρώνα.
2. Να απελευθερώνεται ως απάντηση στο δυναμικό δράσης που φτάνει στην προσυναπτική απόληξη, Ca^{2+} - εξαρτώμενα.
3. Στο μετασυναπτικό κύτταρο να βρίσκονται υποδοχείς της ουσίας, οι οποίοι θα ενεργοποιηθούν και θα μεταδώσουν το μήνυμα στο κύτταρο στόχο.

1. Πρέπει να βρίσκεται αποθηκευμένη μέσα σε κυστίδια στον προσυναπτικό νευρώνα.
2. Πρέπει να απελευθερώνεται ως απάντηση στο δυναμικό δράσης που φτάνει στην προσυναπτική απόληξη και η απελευθέρωση πρέπει να είναι Ca^{2+} - εξαρτώμενη.
3. Ειδικό υποδοχείς της ουσίας πρέπει να βρίσκονται στο μετασυναπτικό κύτταρο.

Οι νευροδιαβιβαστές σε αντίθεση με τις ορμόνες, οι οποίες μέσω του αίματος μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις και ενεργοποιούν τον ιστό στόχο τους, δρουν μόνο στο γειτονικό τους περιβάλλον, σε απόσταση μικρότερη του μη (παρακρινής επικοινωνία) (**Εικόνα 1.58**). Στην περίπτωση ενός επιμήκου κινητηρίου νευρώνα, του οποίου ο άξονας φτάνει το ένα μέτρο, ο νευροδιαβιβαστής παράγεται στο σώμα του νευρώνα, μεταφέρεται μέσω του άξονα στο συναπτικό άκρο, όπου αποθηκεύεται μέσα σε κυστίδια. Ως απάντηση στο δυναμικό δράσης που φτάνει στην απόληξη του νευρώνα, ο νευροδιαβιβαστής απελευθερώνεται στη σύναψη και δρα μέσα στο εύρος της συναπτικής σχισμής.

Προσυναπτικός
νευρώνας





Οι νευροδιαβιβαστές χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους **μικρού μοριακού βάρους νευροδιαβιβαστές** (βιογενείς αμίνες, αμινοξέα, πουρίνες και την ακετυλοχολίνη) και τα **νευροπεπτίδια** (μεγάλα μόρια 3-36 αμινοξέων, όπως τα οπιοειδή πεπτίδια).

Πίνακας 1.5

Διάκριση των νευροδιαβιβαστών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

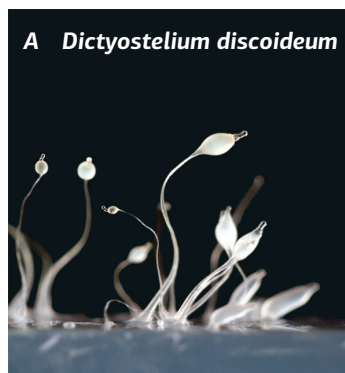
Μικρομοριακοί νευροδιαβιβαστές	Νευροπεπτίδια
Αμίνες	Οπιοειδή πεπτίδια
Τεταρτοταγείς αμίνες: Ακετυλοχολίνη (ACh)	Met-εγκεφαλίνη
Μονοαμίνες: Κατεχολαμίνες: Νοραδρεναλίνη (NA)	Leu-εγκεφαλίνη
Αδρεναλίνη	β-ενδορφίνη
Ντοπαμίνη (DA)	Δυνορφίνη A
Ινδολαμίνες: Σεροτονίνη (5-HT)	
Μελατονίνη	
Ισταμίνη	
Αμινοξέα	Πεπτίδια
γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)	Σωματοστατίνη (SST)
Γλουταμινικό οξύ (Glu)	Ουσία P (SP)
Γλυκίνη (Gly)	Χολοκυστοκινίνη (CCK)
	Βασοπρεσίνη και ωκυτοκίνη
	Νευροπεπτίδιο Y (NPY)

Εικόνα 1.58

Η δράση του νευροδιαβιβαστή περιορίζεται τοπικά στον χώρο όπου απελευθερώνεται, επηρεάζοντας μόνο έναν νευρώνα (A), περισσότερους από έναν (B) ή ένα μυϊκό κύτταρο-νευρομυϊκή σύναψη (Γ). [17]

4.5 Το ATP και το cAMP ως εξωκυτταρικά μηνύματα

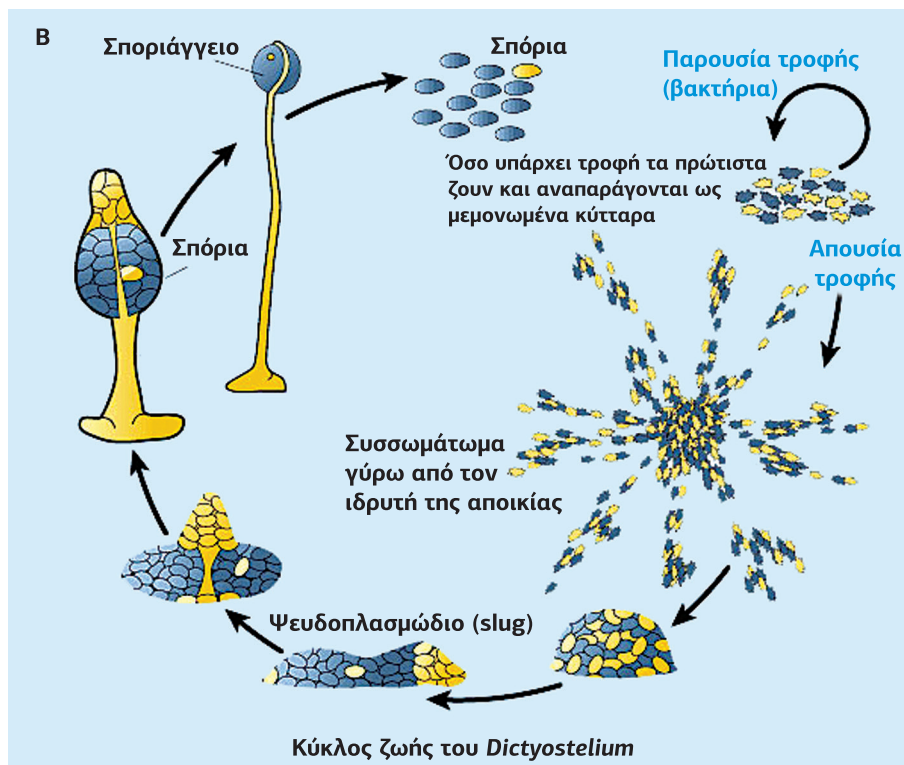
Αν και το ATP είναι ευρέως γνωστό ως το ενεργειακό νόμισμα των κυττάρων, μπορεί να υπάρξει και εξωκυτταρικά. Το ATP παράγεται από τον αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόλυσης σε μικρές ποσότητες, οι οποίες όμως δεν είναι αρκετές για να υποστηρίξουν τις έντονες δραστηριότητες των κυττάρων και γι' αυτό η πλειοψηφία του ATP παράγεται από την αερόβια αναπνοή στα μιτοχόνδρια. Αν και είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων, το ATP μπορεί να απελευθερωθεί εξωκυτταρικά από κύτταρα τα οποία εκκρίνουν νευροδιαβιβαστές, από κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων ή ακόμη και από λεμφοκύτταρα. Ο κυτταρικός θάνατος, επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση ενδοκυτταρικού ATP και, συνεπώς, να αυξήσει τοπικά τη συγκέντρωσή του από nM σε μM. Για την απομάκρυνση του ATP από τον εξωκυτταρικό χώρο υπάρχουν τρεις διαφορετικές εξωνουκλεάσες, υπεύθυνες για την υδρόλυση του ATP σε αδενοσίνη.



Εικόνα 1.59

A. Τα πρώτιστα *Dictyostelium discoideum* όσο υπάρχει τροφή (βακτήρια) ζουν και αναπαράγονται ως μεμονωμένα κύτταρα. B. Διακρίνεται ο κύκλος ζωής του *Dictyostelium* παρουσία και απουσία τροφής.

Το *Dictyostelium* ζει στο έδαφος, τρέφεται με βακτήρια και αναπαράγεται με μίτωση. Η έλλειψη τροφής πυροδοτεί μια κοινωνική συμπεριφορά στα *Dictyostelium* ικανή να οδηγήσει στην επιβίωσή τους, με έναν τρόπο πολύ αλτρουιστικό, καθώς το 20% των κυττάρων που θα δημιουργήσουν το στέλεχος πεθαίνει για να επιβιώσει το υπόλοιπο 80% που θα διαφοροποιηθούν σε σπόρια. Όταν οι μυξαμοιβάδες συγκεντρωθούν όλες (περίπου 10^6 κύτταρα) γύρω από το αρχικό κύτταρο σχηματίζουν μια μάζα κυττάρων γνωστή ως ψευδοπλασμώδιο, το οποίο έχει μορφή γυμνοσαλλίγκαρου (slug). Το ψευδοπλασμώδιο κινείται προς περιοχές ευνοϊκές για διάχυση, βλάστηση και πολλαπλασιασμό των σπορίων. Τα κύτταρα διαφοροποιούνται νωρίς πριν ακόμη σταματήσει η μετακίνησή τους. Τα κύτταρα του πρόσθιου μέρους διαφοροποιούνται σε κύτταρα στελέχους (το 20%), τα οποία πεθαίνουν, ενώ τα υπόλοιπα σε σπορογόνα, κύτταρα σε μια λανθάνουσα φάση που μπορούν να ζήσουν για μήνες απουσία θρεπτικών. Στην κορυφή του στελέχους σχηματίζεται το σποριάγγειο, το οποίο ανοίγει όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές.

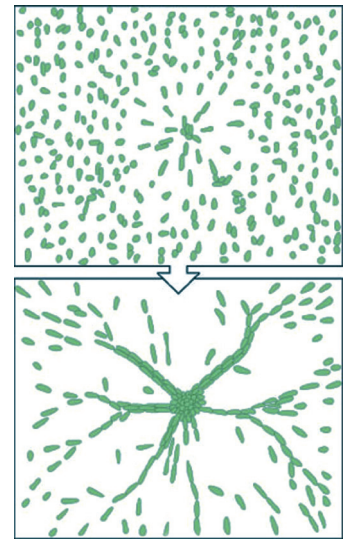
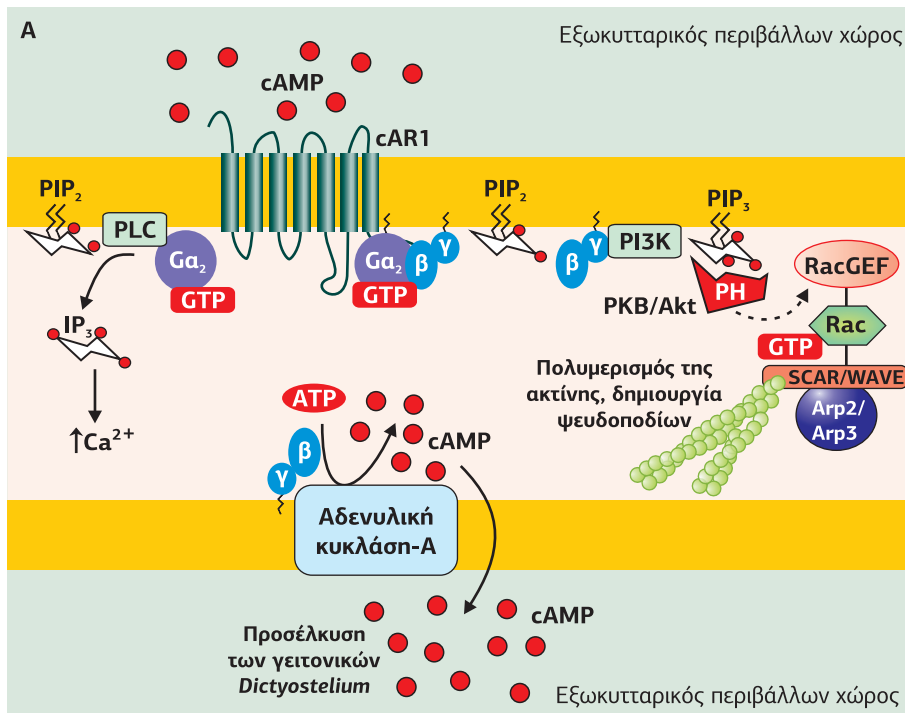


Ωστόσο, πολλά είδη κυττάρων έχουν στην επιφάνειά τους πουρινοϋποδοχείς ικανούς να αναγνωρίσουν και να δεσμεύσουν το εξωκυτταρικό ATP. Κύτταρα που έχουν ανάλογους υποδοχείς είναι τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα κύτταρα του παγκρέατος.

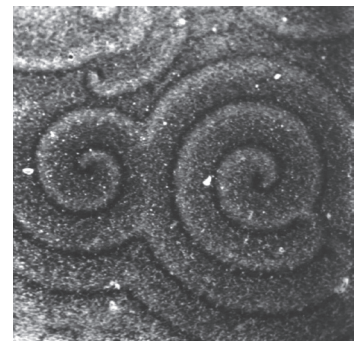
Οι πουρινοϋποδοχείς κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, P1 και P2, ανάλογα με την εξειδίκευσή τους ως προς την αδενοσίνη, με τους P2 να έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το ATP. Οι P2 υποδιαιρούνται σε 4 ομάδες ανάλογα με τη δράση τους και μπορεί να είναι GPCRs (P2Y) ή υποδοχείς-κανάλια ιόντων (P2X). Ο ρόλος του εξωκυτταρικού ATP δεν είναι πλήρως γνωστός. Έχει βρεθεί ότι μεσολαβεί στην αναγνώριση αλγογόνων σημάτων που προέρχονται είτε από καταστροφή νευρώνων είτε από χρόνια φλεγμονή, παίζει ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ νευρώνων και γλοίας και επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της αύξησης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} .

Επίσης, είναι χαρακτηριστικό ότι ορισμένα πρώτιστα, όπως η βλέννα (slime mold) *Dictyostelium discoideum*, χρησιμοποιούν ως εξωκυτταρικό σήμα ένα άλλο νουκλεοτίδιο, το **cAMP**, το οποίο είναι ευρέως γνωστό ως ενδοκυτταρικός δεύτερος διαβιβαστής. Βρέθηκε ότι το cAMP σε αυτούς τους οργανισμούς ρυθμίζει εξωκυτταρικά την κυτταρική προσκόλληση των *Dictyostelium* και τη συσσωμάτωσή τους σε μια αποικία (Εικόνα 1.59).

Ο ιδρυτής της αποικίας ως απάντηση σε έναν στρεσογόνο παράγοντα, π.χ. έλλειψη τροφής, αρχίζει να εκκρίνει cAMP. Τα γειτονικά *Dictyostelium* ανιχνεύουν αυτό το σήμα και ανταποκρίνονται με δύο τρόπους: κινούνται προς το σήμα και εκκρίνουν περισσότερο cAMP για την ενίσχυση του σήματος. Το αποτέλεσμα είναι να μεταδίδουν το σήμα σε όλο τον γειτονικό πληθυσμό και να προκαλούν, χημειοτακτικά, κίνηση προς την περιοχή της υψηλότερης συγκέντρωσης cAMP με τον ακόλουθο μηχανισμό. Αρχικά, στο *Dictyostelium* ιδρυτή της αποικίας, ο υποδοχέας στρες της κυτταρικής του μεμβράνης ενεργοποιεί μία Gαβγ-πρωτεΐνη, η οποία διεγείρει μια ειδική αδενοβυλική κυκλάση που εκφράζεται μόνο κατά τη διαδικασία της συσσωμάτωσης (AC-B, adenylate cyclase-B). Ως αποτέλεσμα παράγεται cAMP, ένα μέρος του οποίου διαχέεται έξω από κύτταρο, ενώ ένα μέρος παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Το cAMP που παραμένει στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί μια PKA, η οποία



B



φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούν μέσω μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων την ανάπτυξη του αρχικού *Dictyostelium*, το οποίο βρίσκεται στο κέντρο της αποικίας που πρόκειται να δημιουργηθεί. Το εξωκυτταρικό cAMP συνδέεται σε ειδικούς GPCRs (G-protein coupled receptors) που ονομάζονται **cAR1** (cAMP receptors) των γειτονικών *Dictyostelium*. Οι cAR1 ενεργοποιούν μια $G_{\alpha_2}\beta\gamma$ -πρωτεΐνη, η οποία μέσω της ενεργοποίησης ενός μεγάλου αριθμού τελεστών διεγείρει τη διαδικασία της χημιοταξίας. Οι $G\beta\gamma$ υπομονάδες αφενός ενεργοποιούν την **αδενυλική κυκλάση-A** (AC-A) αυξάνοντας την παραγωγή cAMP, το οποίο απελευθερώνεται εξωκυτταρικά προσελκύοντας όλο και περισσότερα *Dictyostelium*, και αφετέρου την **κινάση λιπιδίων PI3K**, η οποία φωσφορυλιώνει τα μεμβρανικά λιπίδια PIP_2 σε PIP_3 . Στα PIP_3 προσελκύεται και προσκολλάται η κινάση PKB/Akt, η οποία επάγει την πόλωση του κυττάρου, και ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων RacGEF, ο οποίος ενεργοποιεί τις μικρές GTPάσες Rac/Cdc42 που επάγουν την επέκταση των ψευδοποδίων και τη μετακίνηση του *Dictyostelium*, με σκοπό τη δημιουργία ενός πολυκυτταρικού συσσωματώματος (**Εικόνα 1.60A**).

Μέσα σε δύο ώρες από την έλλειψη θρεπτικών δημιουργείται μια πολυκυτταρική αποικία. Καθώς τα *Dictyostelium* κινούνται προς την αυξημένη διαβάθμιση της συγκέντρωσης του cAMP για εξήντα δευτερόλεπτα και σταματούν έως την επόμενη απελευθέρωση cAMP, αυτή η συμπεριφορά των μεμονωμένων κυττάρων προκαλεί μια συμπεριφορά ταλάντωσης σε μια ομάδα κυττάρων και τα κύματα της μεταβολής της συγκέντρωσης cAMP διαδίδονται μέσω της ομάδας σε σπείρες (**Εικόνα 1.60B**).

4.6

Φερομόνες: χημική επικοινωνία μεταξύ οργανισμών

Ο όρος φερομόνες αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1959 από τους P. Karlson και M. Luscher. Προέρχεται από τη λέξη “φέρω”/μεταφέρω μακριά και τη λέξη “ορμόνη”. Είναι ουσίες που εκκρίνονται από ένα άτομο και δρουν σε ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους.

Πολλά βακτηριακά είδη χρησιμοποιούν φερομόνες για την επικοινωνία τους, με ορατά αποτελέσματα εάν ο πληθυσμός των βακτηρίων έχει φτάσει σε μια συγκε-

Εικόνα 1.60

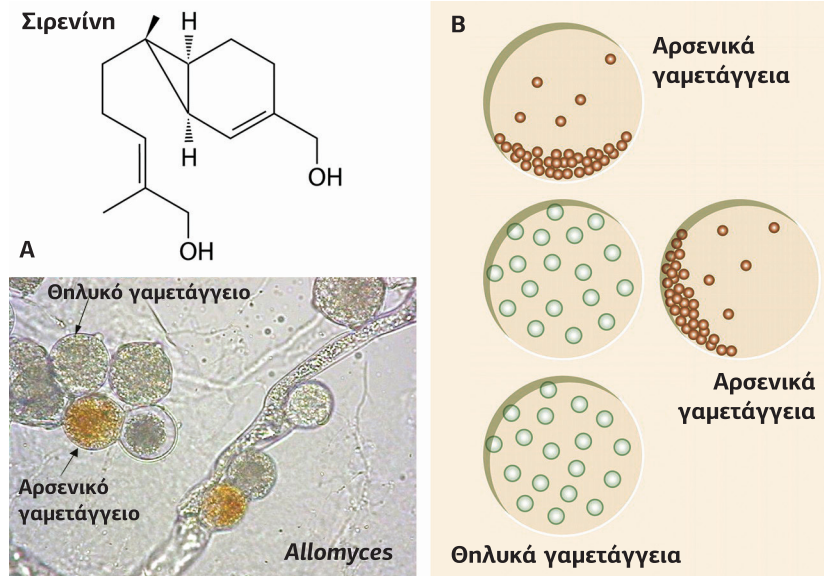
A. Η έλλειψη θρεπτικών επάγει την απελευθέρωση cAMP από το *Dictyostelium discoideum* που παίζει τον ρόλο ιδρυτή της αποικίας και προσελκύει τα γειτονικά *Dictyostelium* απελευθερώνοντας cAMP

α. μέσω του μονοπατιού $cAR1 - G\beta\gamma - PI3K - PIP_3$ (στα φωσφατυδιλο-ινοσιτίδια PIP_3 συνδέονται η κινάση PKB/Akt και ο παράγοντας RacGEF ενεργοποιώντας την πόλωση του κυττάρου και τη δημιουργία ψευδοποδίων),

β. μέσω του μονοπατιού $cAR1 - G_{\alpha_2} - PLC - IP_3 - Ca^{2+}$ και γ / μέσω του μονοπατιού $cAR1 - G\beta\gamma - AC-A - cAMP$, το οποίο απελευθερώνεται εξωκυτταρικά προσελκύοντας περισσότερα *Dictyostelium*. B. Η δημιουργία του πολυκυτταρικού συσσωματώματος γίνεται με τη μορφή σπειροειδών κυμάτων.

Εικόνα 1.61

A. Διακρίνονται τα θηλυκά και τα αρσενικά γαμετάγγεια του *Allomyces*. B. Οι θηλυκοί γαμέτες του θαλάσσιου μύκητα *Allomyces* απελευθερώνουν τη φερομόνη σιρενίνη, η οποία προσελκύει με χημειοταξία τους αρσενικούς γαμέτες. Στην εικόνα διακρίνονται δισκία petri με άγαρ, όπου καλλιεργούνται αρσενικά ή θηλυκά γαμετάγγεια, και παρατηρούμε ότι τα αρσενικά γαμετάγγεια (που φέρουν τους αρσενικούς γαμέτες) συσσωρεύονται προς την πλευρά των θηλυκών. [11]



κριμένη πυκνότητα. Ως απάντηση στις φερομόνες το άλλο άτομο μπορεί να παράγει φωτοβολία, τοξικά προϊόντα ή να ενεργοποιηθεί για σύζευξη (μεταφορά πλασμιδίου). Η χημική δομή των βακτηριακών φερομονών ποικίλλει, από αμινοξέα, μικρά πεπτίδια, πρωτεΐνες έως και διακλαδισμένα λιπαρά οξέα. Μία από τις μεγαλύτερες ομάδες φερομονών είναι η AHLs (N-Acetyl-L-Homoserine Lactones). Οι φερομόνες AHLs όχι μόνο προκαλούν μια απάντηση σε ένα άλλο άτομο, αλλά επίσης επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων της παραγωγής τους.

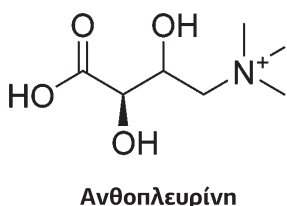
Φερομόνες δεν χρησιμοποιούν μόνο οι προκαρυώτες για την επικοινωνία τους, αλλά και οι ανώτεροι οργανισμοί. Ο θαλάσσιος μύκητας *Allomyces* χρησιμοποιεί τη φερομόνη **σιρενίνη** (sirenin), η οποία εκκρίνεται από τους θηλυκούς γαμέτες και προσελκύει του αρσενικούς γαμέτες (Εικόνα 1.61).

Ένας άλλος μύκητας, η *Achlya*, χρησιμοποιεί δύο στεροειδείς φερομόνες, η μία παράγεται από το αρσενικό (antheridiol) και η άλλη από το θηλυκό (oogoniol). Η ανίχνευση της αρσενικής φερομόνης από το θηλυκό είναι καθοριστική για την ανάπτυξη του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος και ομοίως το αρσενικό χρειάζεται να ανιχνεύσει τη θηλυκή φερομόνη για την ανάπτυξη του δικού του αναπαραγωγικού συστήματος.

Η θαλάσσια ανεμώνη *Anthopleura elegantissima* χρησιμοποιεί ένα θετικά φορτισμένο οργανικό συστατικό που ονομάζεται **ανθοπλευρίνη**. Είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα φερομόνη καθώς διανέμεται από ένα δεύτερο είδος. Όταν η ανεμώνη τρώγεται από το θαλάσσιο σαλιγκάρι, το σαλιγκάρι πέπτει τη φερομόνη της ανεμώνης και στη συνέχεια την απελευθερώνει στο περιβάλλον. Σε αυτήν την περίπτωση η φερομόνη δρα ως προειδοποίηση για την επικινδυνότητα του σαλιγκαριού και οι

Εικόνα 1.62

Όταν η θαλάσσια ανεμώνη *Anthopleura elegantissima* τρώγεται από ένα θαλάσσιο σαλιγκάρι, το σαλιγκάρι πέπτει τη θετικά φορτισμένη φερομόνη ανθοπλευρίνη και την απελευθερώνει στο περιβάλλον. Η ανθοπλευρίνη ειδοποιεί τις γειτονικές ανεμώνες, οι οποίες μέσα σε 3 sec συρρικνώνονται για να προστατευθούν.



Χρόνος 0 sec



2,8 sec μετά την επίθεση από το θαλάσσιο σαλιγκάρι

γειτονικές ανεμώνες μέσα σε λίγα sec συρρικνώνονται για να προστατευτούν (**Εικόνα 1.62**).

Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που αφορά τις φερομόνες διεξήχθη από τον Adolph Butenard, έναν Γερμανό οργανικό χημικό, ο οποίος εργάστηκε με τον μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Το έντομο αυτό χρησιμοποιεί ως φερομόνη για την προσέλκυση συντρόφου τη **βομβυκόλη**, ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ με C16 (**Εικόνα 1.63**).

Και οι ανώτεροι οργανισμοί χρησιμοποιούν φερομόνες, μεταξύ των οποίων ψάρια, αμφίβια, ακόμη και θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Αν και είναι αδύνατο να συζητήσουμε όλες τις λεπτομέρειες, η βασική ιδέα είναι ίδια: ένα άτομο επικοινωνεί με ένα άλλο μέσω χημικών διαβιβαστών, με τρόπο ανάλογο της επικοινωνίας ανάμεσα σε δύο κύτταρα.

5. Ενίσχυση του σήματος

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια ενισχύουν το αρχικό σήμα που δέχεται ο υποδοχέας κατά τη διάρκεια της μεταγωγής. Σε πολλές περιπτώσεις μερικά μόνο μόρια διαβιβαστή είναι αρκετά για να ξεκινήσουν σε ένα κύτταρο μια ενζυμική αντίδραση, κατά την οποία ενεργοποιούνται πολλά μόρια υποστρώματος.

Το ποσοστό ενίσχυσης ή παράγοντας ενίσχυσης (amplification factor) ποικίλλει στα διαφορετικά επίπεδα του σηματοδοτικού μονοπατιού. Μια αρχική ενίσχυση συμβαίνει στο επίπεδο του συμπλόκου διαβιβαστή-υποδοχέα. Ένας ενεργοποιημένος υποδοχέας είναι ικανός να ενεργοποιήσει καθοδικά πολλές πρωτεΐνες τελεστές (downstream effector proteins) (**Εικόνα 1.64**).

Η ενίσχυση του σήματος στο επίπεδο του συμπλόκου διαβιβαστή-υποδοχέα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

Από τη διάρκεια ζωής του συμπλόκου διαβιβαστή-υποδοχέα: Η διάρκεια ζωής του συμπλόκου εξαρτάται από τον ρυθμό αποσύνδεσης του δεσμευμένου διαβιβαστή από τον υποδοχέα.

Από τη συχνότητα της αντίδρασης με την πρωτεΐνη τελεστή (effector): Ένας ενεργοποιημένος υποδοχέας μπορεί να μεταδώσει περαιτέρω το μήνυμα εάν συναντήσει την πρωτεΐνη τελεστή. Η συχνότητα με την οποία αυτό συμβαίνει εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τον ρυθμό διάχυσης των δύο συστατικών.

Από την απενεργοποίηση του συμπλόκου διαβιβαστή-υποδοχέα: Η μετάδοση του μηνύματος από το σύμπλοκο διαβιβαστή-υποδοχέα μπορεί να ανασταλεί μέσω τροποποιήσεων (όπως φωσφορυλίωση πρωτεϊνών), οι οποίες απενεργοποιούν το σύμπλοκο. Ένας άλλος μηχανισμός τερματισμού του μηνύματος είναι η εσωτερικήευση (internalization) του συμπλόκου στο εσωτερικό του κυττάρου. Κατά την εσωτερικήευση ένα τμήμα της μεμβράνης, μαζί με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται πάνω του, αποκόβεται και μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Από εκεί ο υποδοχέας μπορεί είτε να επιστρέψει στη μεμβράνη του κυττάρου είτε να αποικοδομηθεί. Η εσωτερικήευση μπορεί να προσβάλει τόσο δεσμευμένους με διαβιβαστή υποδοχείς όσο και ελεύθερους.

Βομβυκόλη



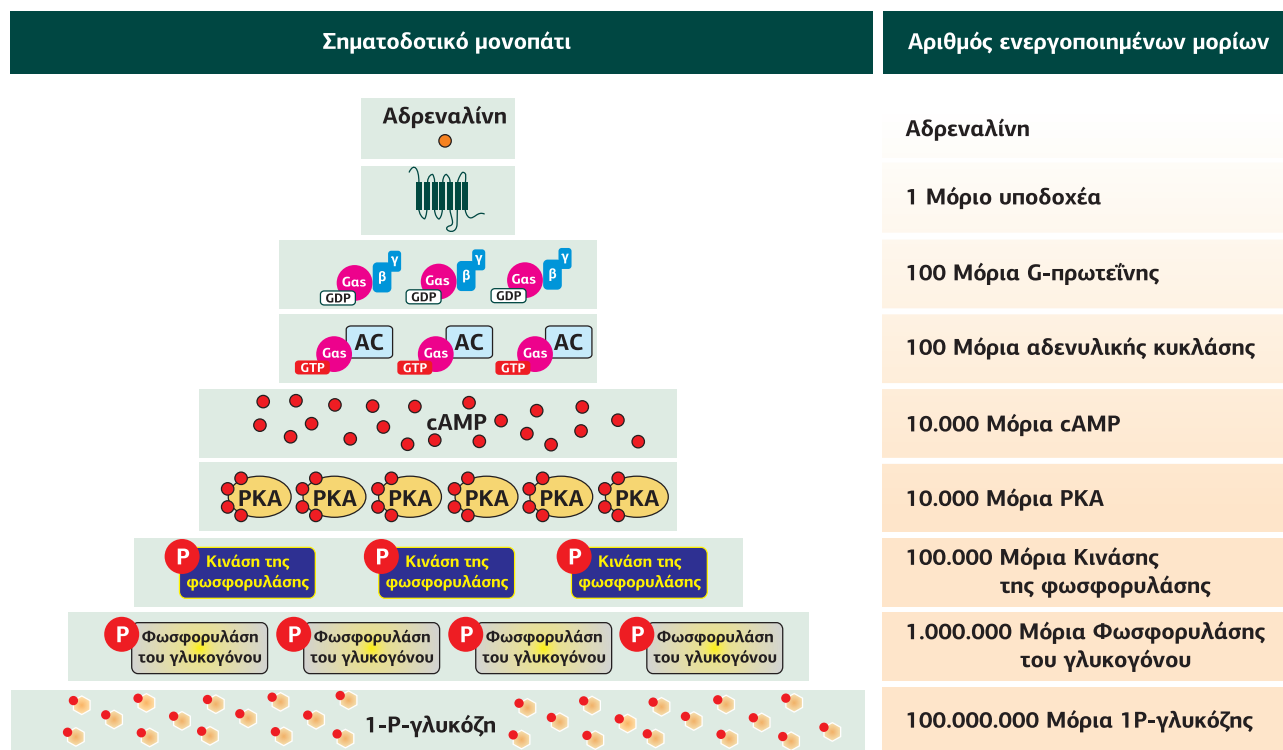
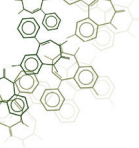
Εικόνα 1.63

Ο θηλυκός μεταξοσκώληκας *Bombyx mori* χρησιμοποιεί ως φερομόνη για την προσέλκυση του αρσενικού συντρόφου τη βομβυκόλη, ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ με C16, το οποίο αναγνωρίζει ο αρσενικός μεταξοσκώληκας μέσω πολύ ευαίσθητων υποδοχέων που βρίσκονται στις κεραίες του.

5.1

Ενίσχυση του σήματος κατά τη διαδικασία της φωτοδιαβίβασης

Ένα από τα παραδείγματα όπου ο παράγοντας ενίσχυσης του σήματος στο επίπεδο του συμπλόκου διαβιβαστή-υποδοχέα μπορεί να προσδιοριστεί είναι η φωτοδιαβίβαση. Κατά τη διαδικασία της φωτοδιαβίβασης το φωτεινό σήμα προσλαμβάνεται από τους φωτοϋποδοχείς (ροδοψίνη) των φωτοευαίσθητων κυττάρων του αμφιβληστροειδή, ισομεριώνεται η 11-cis-ρετινάλη (που είναι συνδεδεμένη στη



Εικόνα 1.64
Μηχανισμός ενίσχυσης του αρχικού σήματος. Ένας ενεργοποιημένος από την αδρεναλίνη υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιήσει πολλές G-πρωτεΐνες (100). Η α -υπομονάδα της κάθε G-πρωτεΐνης θα ενεργοποιήσει ένα μόνο μόριο τελεστή, στο παράδειγμα την αδενυλική κυκλάση. Η αδενυλική κυκλάση ενισχύει το σήμα παράγοντας 100 μόρια δεύτερου διαβιβαστή (cAMP). Τέσσερα μόρια cAMP απαιτούνται για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), ένα στάδιο κατά το οποίο το σήμα δεν ενισχύεται. Στη συνέχεια, η PKA μπορεί να έχει ποικίλες δράσεις, στην εικόνα φαίνεται να φωσφορυλιώνει την κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η ενεργοποιημένη φωσφορυλάση παράγει στη συνέχεια 10^8 μόρια 1-P-γλυκόζης. Ξεκινώντας λοιπόν από ένα μόριο ενεργοποιημένου υποδοχέα καταλήγουμε σε 10^8 μόρια γλυκόζης.

ροδοψίνη) σε all-trans-ρετινάλη οδηγώντας σε ενεργοποίηση των υποδοχέων. Η ενεργοποιημένη ροδοψίνη μεταφέρει το μήνυμα σε μια G-πρωτεΐνη, την τρανσδουσίνη (T: transducin), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τον επόμενο τελεστή, τη φωσφοδιεστεράση του cGMP. Η φωσφοδιεστεράση υδρολύει το cGMP σε GMP. Στο πρώτο βήμα μεταγωγής του σήματος, από τον ενεργοποιημένο φωτοϋποδοχέα στην τρανσδουσίνη, η ενίσχυση είναι μεγάλη: **ένα μόριο ενεργοποιημένης ροδοψίνης μπορεί να ενεργοποιήσει 1.000-2.000 μόρια τρανσδουσίνης το δευτερόλεπτο.** Στο επόμενο βήμα, από την τρανσδουσίνη στη φωσφοδιεστεράση, δεν παρατηρείται καμία ενίσχυση εφόσον ένα μόριο τρανσδουσίνης ενεργοποιεί ένα μόνο μόριο φωσφοδιεστεράσης. Η επόμενη ενίσχυση του σήματος παρατηρείται στο επίπεδο της ενεργοποιημένης φωσφοδιεστεράσης, η οποία υδρολύει πολύ γρήγορα το cGMP σε GMP (K_{cat} περίπου 4000 sec^{-1}).

Ο **χρόνος ημιζωής** της ενεργοποιημένης μορφής μιας σηματοδοτικής πρωτεΐνης αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό σημείο στην αλληλουχία των κυτταρικών αντιδράσεων. Η παράταση ή η ελάττωση της διάρκειας της ενεργοποιημένης της μορφής μπορεί να οδηγήσει στην ενίσχυση ή στην εξασθένηση, αντίστοιχα, της μετάδοσης του μηνύματος.

Ο *in vivo* προσδιορισμός του συντελεστή ενίσχυσης σπάνια είναι δυνατός. Για να προσδιορίσουμε τον συντελεστή ενίσχυσης θα πρέπει πρώτα να έχουμε προσδιορίσει ορισμένες παραμέτρους όπως:

- ο χρόνος ημιζωής της ενεργοποιημένης κατάστασης της σηματοδοτικής πρωτεΐνης,
- η συγκέντρωση της σηματοδοτικής πρωτεΐνης και του τελεστή στον οποίο δρα και, τέλος,
- το μέγεθος της διαδικασίας απενεργοποίησης.

Οι παράμετροι αυτές είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστούν πειραματικά. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι αποτελεί έναν κύριο λανθάνοντα παράγοντα. Ένας επιπλέον παράγοντας σύγχυσης είναι η σύνδεση πολλών σηματοδοτικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη, γεγονός που δεν επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσής τους.

6. Ρύθμιση της δια- και ενδο-κυτταρικής σηματοδότησης

Το αποτέλεσμα της επικοινωνίας ανάμεσα στο σηματοδοτικό κύτταρο και το κύτταρο στόχο είναι μια συγκεκριμένη βιοχημική αντίδραση στο κύτταρο στόχο. Η φύση και η έκταση αυτής της αντίδρασης εξαρτάται από πολλές μεμονωμένες διαδικασίες, οι οποίες συμμετέχουν είτε άμεσα είτε έμμεσα στη μεταγωγή του σήματος.

Ξεκινώντας από το κύτταρο που παράγει τον διαβιβαστή, οι παρακάτω διαδικασίες συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος στους ανώτερους οργανισμούς (**Εικόνα 1.65**):

1. Βιοσύνθεση του διαβιβαστή από το σηματοδοτικό κύτταρο.
2. Αποθήκευση και έκκριση του διαβιβαστή.
3. Μεταφορά του διαβιβαστή στο κύτταρο στόχο.
4. Σύνδεση του διαβιβαστή σε ειδικούς υποδοχείς του κυττάρου στόχου.
5. Καταρράκτης βιοχημικών αντιδράσεων στο κύτταρο στόχο: Μετάδοση και ενίσχυση του σήματος.
6. Χημική αποικοδόμηση του διαβιβαστή.

Όλα τα παραπάνω βήματα υπόκεινται σε ρύθμιση και δεν είναι απομονωμένα από άλλες κυτταρικές οδούς, άλλα αντίθετα αλληλοσυνδέονται μεταξύ τους. Η βιοσύνθεση ενός διαβιβαστή, για παράδειγμα, μπορεί να ελέγχεται από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Είναι σήματα που επάγουν την έκκριση αποθηκευμένων διαβιβαστών. Επιπλέον, ο καταβολισμός του διαβιβαστή παίζει εξίσου κύριο ρόλο στην αποτελεσματική συγκέντρωσή του μέσα στο κύτταρο.

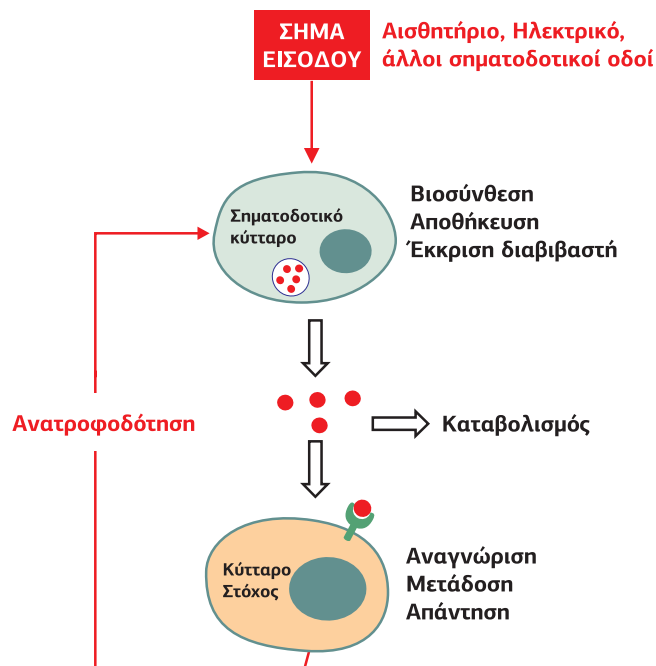
Η ποσότητα, η δραστηριότητα και η εξειδίκευση των υποδοχέων στα κύτταρα στόχους επηρεάζει την έκταση της τελικής βιοχημικής αντίδρασης. Η προκαλούμενη αλληλουχία αντιδράσεων στο κύτταρο στόχο μπορεί να ρυθμιστεί σε πολλές θέσεις, π.χ. φωσφορυλίωση που προκαλεί αλλαγή στη δραστηριότητα διαφόρων πρωτεϊνών.

Μια σηματοδοτική αλυσίδα δεν πρέπει να την θεωρούμε ως ένα απομονωμένο γεγονός μέσα στον οργανισμό, αλλά πρέπει να την εντάσσουμε μέσα στο συνολικότερο σύστημα της σηματοδοτικής διαβίβασης. Το κύτταρο διαθέτει ένα μεγάλο ρεπερτόριο σηματοδοτικών μονοπατιών, των οποίων η τελική απάντηση ρυθμίζεται και τα οποία διασταυρώνονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Κάθε μεμονωμένο κύτταρο ενός πολυκύτταρου οργανισμού είναι προγραμματισμένο να αντιδράσει σε πολλά εξωτερικά μηνύματα με έναν χαρακτηριστικό και εξειδικευμένο τρόπο. Ο τρόπος αντίδρασης ενός κυτταρικού τύπου εξαρτάται από τους υποδοχείς που διαθέτει και τα μονοπάτια που χρησιμοποιούνται. Ο τρόπος ρύθμισης και διασταύρωσης-αλληλεπίδρασης των μονοπατιών δεν είναι μόνιμος καθόλη τη διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού, αλλά υπόκειται σε γενετικά προσδιορισμένες τροποποιήσεις.

Εικόνα 1.65

Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών που μπορούν να επηρεάσουν τη δράση ενός διαβιβαστή μέσα στο κύτταρο. Στην εικόνα διακρίνεται η δυνατότητα ενός μηχανισμού ανάδρασης (feedback): για παράδειγμα το σήμα που απελευθερώνεται από το κύτταρο στόχο μπορεί να ρυθμίσει την περαιτέρω σύνθεση ή έκκριση του διαβιβαστή από το σηματοδοτικό κύτταρο.



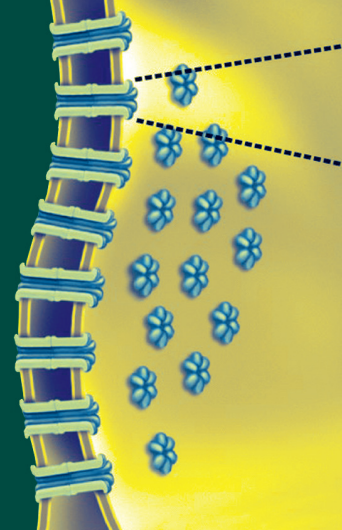


Βιβλιογραφία

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition, Garland Science Group, p.1392 (2007).
2. Chao LH, Pellicena P, Deindl S, Barclay LA, Schulman H, Kuriyan J, Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation, *Nat Struct Mol Biol* **17**: 264–272 (2010).
3. Gibson BA, Kraus WL, New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs, *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 411–424 (2012).
4. Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER, *Signal Transduction*, 2nd edition, Elsevier/Academic Press, p.576 (2009).
5. Hancock JT, *Cell Signaling*, 2nd edition, Oxford University Press, p.316 (2005).
6. Hantschel O, Superti-Furga G, Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl Tyrosine Kinases, *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 33–44 (2004).
7. Hartl F, Bracher A, Hayer-Hartl M, Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* **475**: 324–332 (2011).
8. Helmreich EJ, *The Biochemistry of Cell Signaling*, Oxford University Press, p.328 (2001).
9. Hussain S, Davanger S, The discovery of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex and the molecular regulation of synaptic vesicle transmitter release, *Neuroscience* **190**: 12–20 (2011).
10. Kima J, Welshb E, Oguzc U, Fangc B, Baia Y et al, Dissection of TBK1 signaling via phosphoproteomics in lung cancer cells, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **110**: 12414–19 (2013).
11. Lee S, Ni M, Li W, Shertz C, Heitman J, The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom, *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 298–340 (2010).
12. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS, S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling, *Circ Res* **106**: 633–646 (2010).
13. Marks F, Klingmüller U, Müller-Decker K, *Cellular Signal Processing: An Introduction to the Molecular Mechanisms of Signal Transduction*, 1st edition, Garland Science Group, p.634 (2009).
14. Nalepa G, Rolfe M, Harper J, Drug discovery in the ubiquitin–proteasome system, *Nat Rev Drug Discov* **5**: 596–613 (2006).
15. Nyquist K, Martin A, Marching to the beat of the ring: polypeptide translocation by AAA+ proteases, *Trends Biochem Sci* **39**: 53–60 (2014).
16. Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP, Signal processing in complex chemotaxis pathways, *Nat Rev Microbiol* **9**: 153–165 (2011).
17. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, White LE, *Neuroscience*, 5th edition, Sinauer Associates, p.579 (2011).
18. Soto CS, Clinthorne G, DeGrado WF, Dal Peraro M, Assembly of the Transmembrane Domain of E. coli PhoQ Histidine Kinase: Implications for Signal Transduction from Molecular Simulations, *Lemmin - PLoS Comput Biol* **9**: e1002878 (2013).
19. Strauss G, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 4th edition, Wiley-VCH Editions, p.646 (2008).
20. Sundqvist A, Ericsson J, Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **100**: 13833–38 (2003).

2

Χασμοσύνδεσμοι: Ανοιχτή επικοινωνία μεταξύ παρακείμενων κυττάρων



1. Γενικά χαρακτηριστικά των χασμοσυνδέσμων

- 1.1 Λειτουργικός ρόλος των χασμοσυνδέσμων
- 1.2 Δομή
- 1.3 Σύνθεση και ανακύκλωση των χασμοσυνδέσμων
- 1.4 Ρύθμιση της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας

2. Το πρωτεϊνικό πλέγμα των χασμοσυνδέσμων (nexus)

- 2.1 Πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων
- 2.2 Πρωτεΐνες των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης και του κυτταροσκελετού
- 2.3 Κινάσες και φωσφατάσες τυροσίνης
- 2.4 Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με κοννεξίνες

3. Οι ημιδιάυλοι μπορεί να είναι λειτουργικοί, κάτω από ορισμένες συνθήκες

- 3.1 Ο ρόλος των ημιδιαύλων στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων

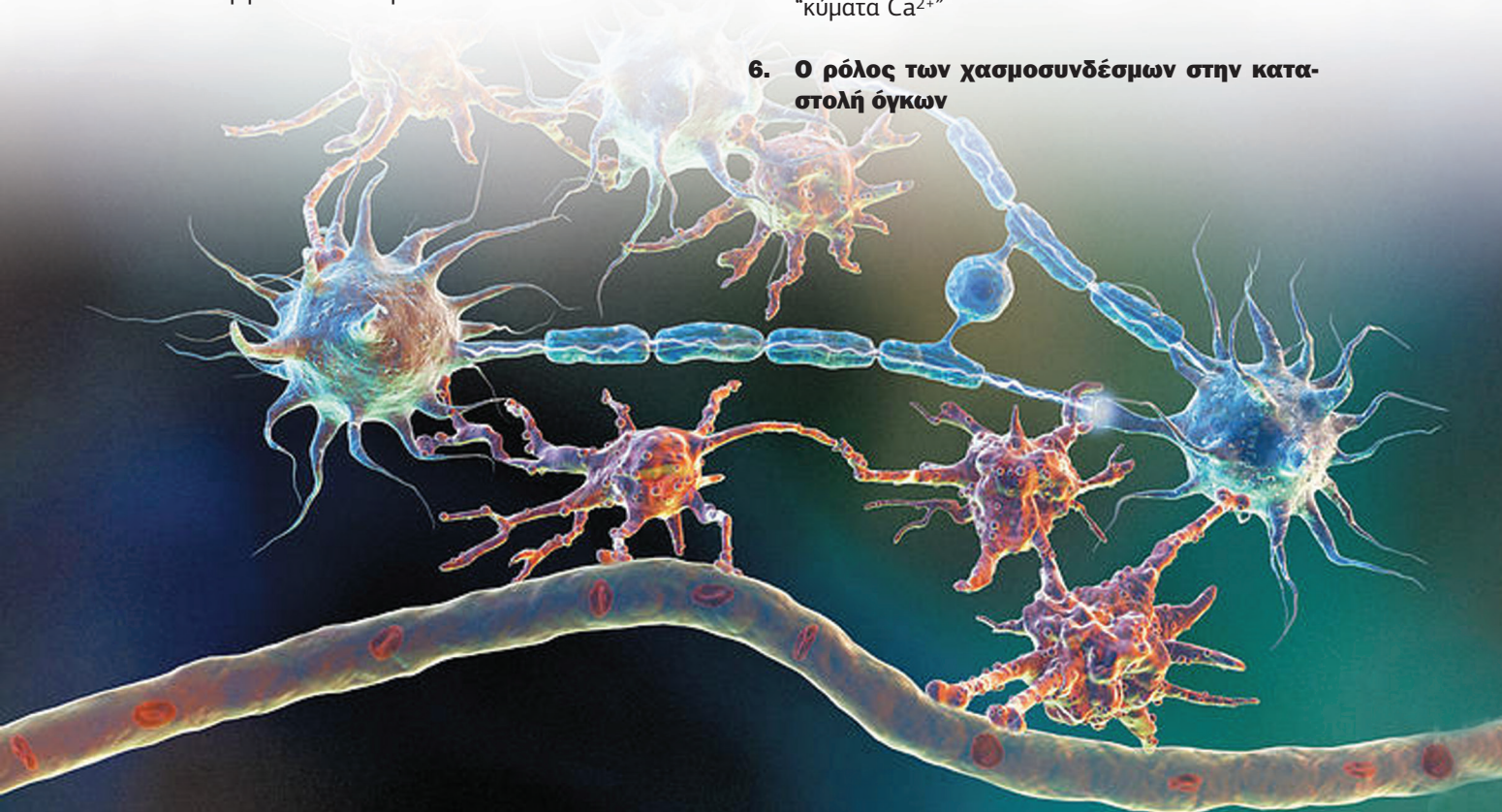
4. Μεταλλάξεις των κοννεξινών δημιουργούν σοβαρές δυσλειτουργίες

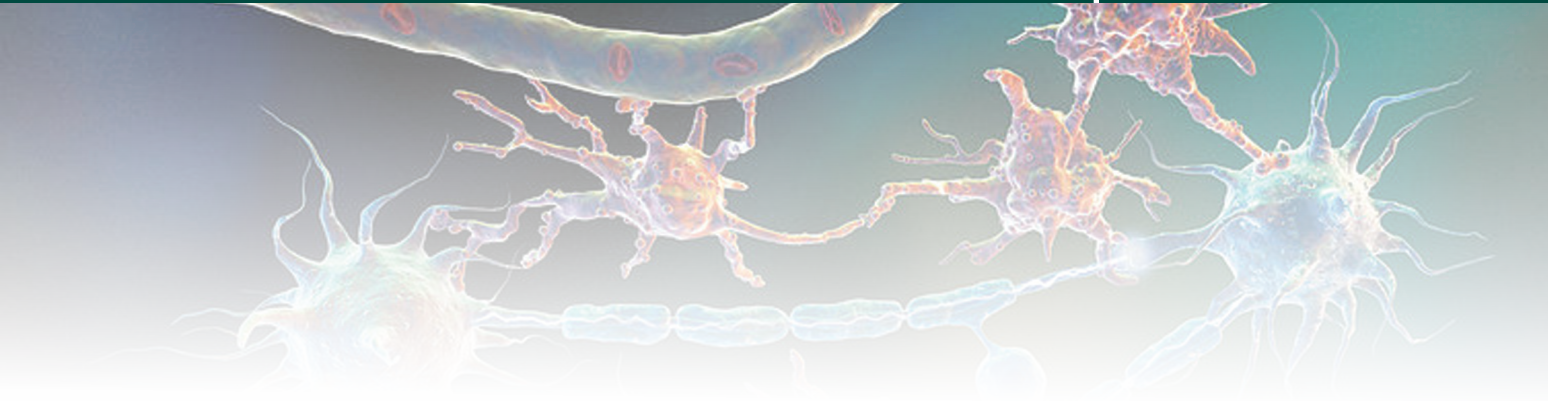
- 4.1 Η Νευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth προκαλείται από μετάλλαξη της Cx32
- 4.2 Το ερυθροκερατόδερμα προκαλείται από μεταλλάξεις των Cx26, Cx31 και Cx30.3
- 4.3 Κληρονομική κώφωση από μεταλλάξεις των Cx26, Cx30, Cx31
- 4.4 Ο καταρράκτης ως αποτέλεσμα έλλειψης Cx43, Cx46 και Cx50
- 4.5 Ανώμαλη καρδιακή αγωγή των δυναμικών απουσία Cx40, Cx45 και Cx43
- 4.6 Ανώμαλη λειτουργία των ωοθυλακίων απουσία Cx37 και Cx43

5. Ο ρόλος των χασμοσυνδέσμων στο νευρικό σύστημα

- 5.1 Χασμοσύνδεσμοι στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού
- 5.2 Χασμοσύνδεσμοι στα κύτταρα της γλοίας και τα "κύματα Ca^{2+} "

6. Ο ρόλος των χασμοσυνδέσμων στην καταστολή όγκων

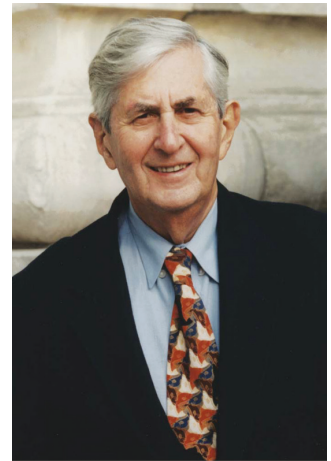




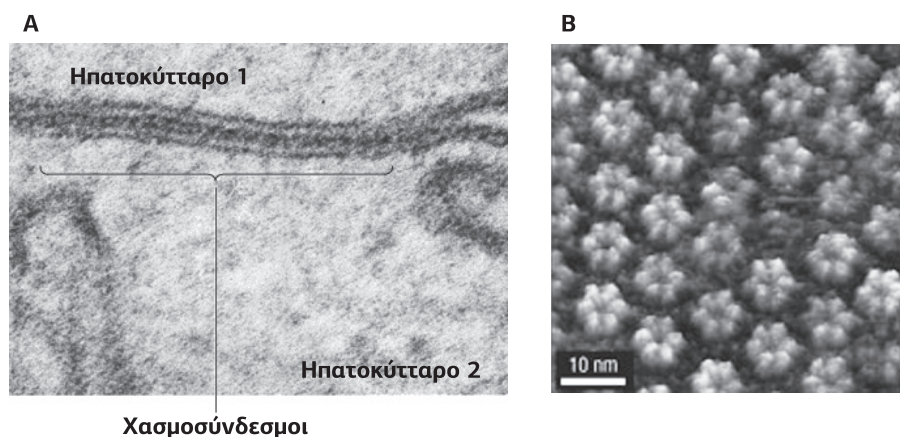
1. Γενικά χαρακτηριστικά των χασμοσυνδέσμων

Ανοικτή σύνδεση ανάμεσα σε νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου χρυσόψαρου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1963 από τον J. David Robertson, ο οποίος με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας περιέγραψε ένα εξαγωνικό πλέγμα υπομονάδων σε περιοχές όπου εφάπτονται οι πλασματικές μεμβράνες των νευρικών ινών των κυττάρων του Mauthner με κινητήριοις νευρώνες. Η ανοικτή αυτή σύνδεση των κυττάρων αποδείχθηκε αργότερα υπεύθυνη για τη γρήγορη απόδραση των ψαριών από τους θηρευτές τους.

Ο όρος “gap junction”/χασμοσύνδεσμος προτάθηκε το 1967 από τους Jean-Paul Revel και Maurice Karnovsky, οι οποίοι μελετώντας τις συνδέσεις μεταξύ καρδιομυοκυττάρων και μεταξύ ηπατοκυττάρων ποντικών περιέγραψαν τη δομή τους (Εικόνα 2.1). Η μικρή απόσταση μεταξύ των γειτονικών κυτταρικών μεμβρανών στην περιοχή των χασμοσυνδέσμων οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία, ιδίως στη μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων (ηλεκτρικές συνάψεις). Αργότερα βρέθηκε ότι μπορούν να μεταφέρονται διαμέσου των χασμοσυνδέσμων και μικρές χημικές ενώσεις.



Maurice Karnovsky



Εικόνα 2.1

A. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των χασμοσυνδέσμων μεταξύ δύο ηπατοκυττάρων. Διακρίνεται η μικρή απόσταση (2-4 nm) μεταξύ των γειτονικών κυτταρικών μεμβρανών στην περιοχή των χασμοσυνδέσμων, σε σχέση με τη φυσιολογική απόσταση 20 nm. B. Κάτοψη των χασμοσυνδέσμων, όπου διακρίνεται η εξαγωνική δομή τους. [36]

Το 1993 ανακαλύφθηκε στον άνθρωπο η πρώτη γενετική ασθένεια που συνδεόταν με μεταλλάξεις πρωτεϊνών των χασμοσυνδέσμων, των κοννεξινών, γεγονός που έδωσε νέα ώθηση στη μελέτη τους. Οι μέθοδοι ανίχνευσης των κοννεξινών με αντισώματα οδήγησαν στον εντοπισμό τους σε όλους τους ιστούς, με εξαίρεση τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα σπερματοζωάρια και τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (αν υπήρχαν χασμοσύνδεσμοι στους σκελετικούς μύες, η μετάδοση της σύσπασης θα ήταν ανεξέλεγκτη).

1.1 | Λειτουργικός ρόλος των χασμοσυνδέσμων

Οι χασμοσύνδεσμοι επιτρέπουν τη μεταφορά ιόντων, μεταβολιτών και δεύτερων διαβιβαστών μικρότερων του 1 kDa (Ca^{2+} , IP_3 , cAMP και ATP), συντονίζοντας τις δραστηριότητες ομάδων κυττάρων, επιταχύνοντας τη διάδοση της νευρικής ώσης ή δημιουργώντας λειτουργικά συγκύτια. Πιο συγκεκριμένα:

- Στην **καρδιά** οι χασμοσύνδεσμοι επιτρέπουν τη γρήγορη μεταφορά της ηλεκτρικής ώσης από κύτταρο σε κύτταρο, εξασφαλίζοντας τη συντονισμένη σύσπαση των καρδιομυοκυττάρων.
- Στο **νευρικό σύστημα** οι χασμοσύνδεσμοι δημιουργούν ανάμεσα σε νευρικά αλλά και σε νευρογλοιακά κύτταρα ηλεκτρικές συνάψεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε μονοπάτια που χρειάζονται μέγιστη ταχύτητα, συγχρονισμένη πυροδότηση (firing) και διακόπτες ανάμεσά τους.
- Σε **μη διεγέρσιμα κύτταρα** οι χασμοσύνδεσμοι δημιουργούν συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε υψηλά διαφοροποιημένα κύτταρα (π.χ. ανάμεσα στα κύτταρα του φακού, στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας κ.λπ.).
- Οι χασμοσύνδεσμοι δρουν, επίσης, και ως **καταστολείς μεταλλάξεων** σε σωματικά κύτταρα (καταστολείς όγκων), ελέγχοντας την ανάπτυξη και τον μετασχηματισμό των κυττάρων.

Υπάρχουν, όμως, λίγες πληροφορίες για το πώς οι χασμοσύνδεσμοι ρυθμίζουν αυτές τις λειτουργίες, γιατί αφενός επιτρέπουν τη μη εκλεκτική δίοδο μεγάλου αριθμού μικρών μορίων και αφετέρου δεν υπάρχουν εξειδικευμένοι αναστολείς τους.

1.2 | Δομή



Εικόνα 2.2

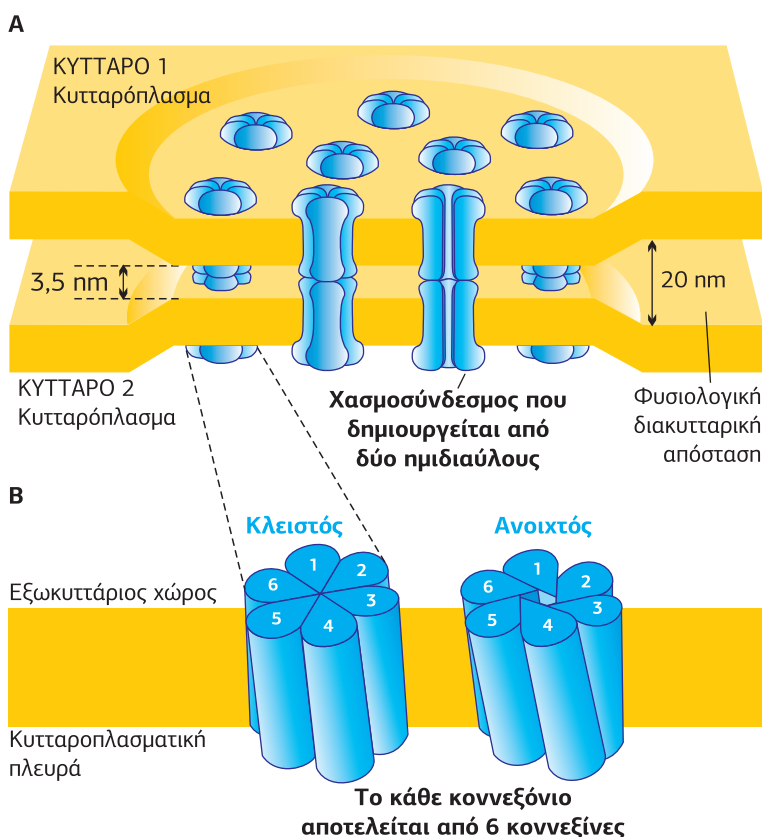
Ηλεκτρονική μικρογραφία μιας πλάκας χασμοσυνδέσμων σε καρδιακά κύτταρα αρουραίου.

Οι χασμοσύνδεσμοι είναι διακυτταρικά κανάλια ανάμεσα σε παρακείμενα κύτταρα. Στο σημείο όπου υπάρχουν οι χασμοσύνδεσμοι το διακυτταρικό χάσμα είναι 3,5 nm αντί για 20 nm. Οι χασμοσύνδεσμοι δημιουργούνται με την ένωση δύο κυτταρικών **ημιδιαύλων-κοννεξονίων**, έναν από κάθε κύτταρο. Κάθε κοννεξόνιο αποτελείται από 6 πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις **κοννεξίνες**, είτε ίδιου τύπου είτε διαφορετικού, οι οποίες δημιουργούν τον κεντρικό πόρο (διάυλο) (**Εικόνα 2.3**).

Οι χασμοσύνδεσμοι δημιουργούν συσσωματώματα, **πλάκες**, που αποτελούνται από λίγους έως πολυάριθμους (10^5) χασμοσυνδέσμους, οι οποίοι άμεσα ενώνουν το κυτταρόπλασμα των γειτονικών κυττάρων (**Εικόνα 2.2**).

Στα ασπόνδυλα (*Drosophila*, *C. elegans*) οι χασμοσύνδεσμοι συγκροτούνται από μία εντελώς διαφορετική οικογένεια πρωτεϊνών, τις **ιννεξίνες**, (innexins επειδή συναντώνται μόνο σε invertebrates) χωρίς καμία ομολογία αλληλουχίας με τις κοννεξίνες.

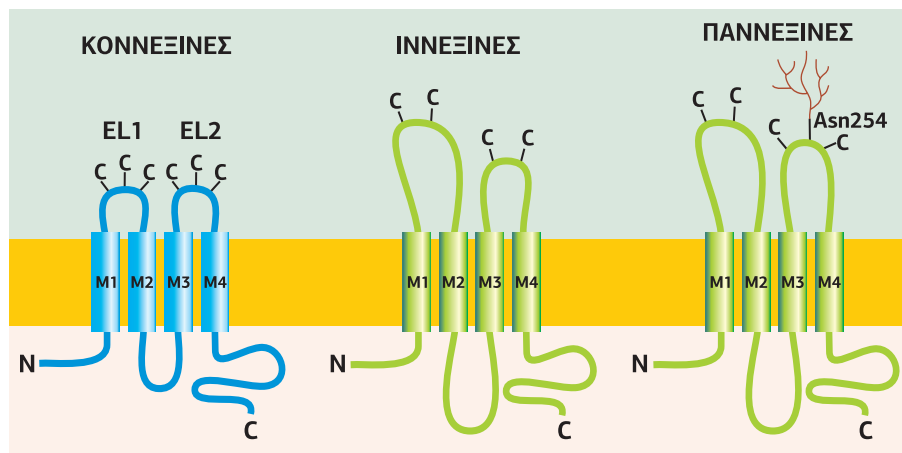
Το 2005 βρέθηκε στα ασπόνδυλα και στα σπονδυλωτά μια ομάδα γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ονομάστηκαν **παννεξίνες** (pannexins, γιατί βρίσκονται παντού) και εμφανίζουν σημαντική ομολογία με τις ιννεξίνες και καμία ομολογία με τις κοννεξίνες. Το γεγονός ότι οι παννεξίνες μπορούν να δημιουργήσουν χασμοσυνδέσμους και συνυπάρχουν στα σπονδυλωτά με τις κοννεξίνες έθεσε

**Εικόνα 2.3**

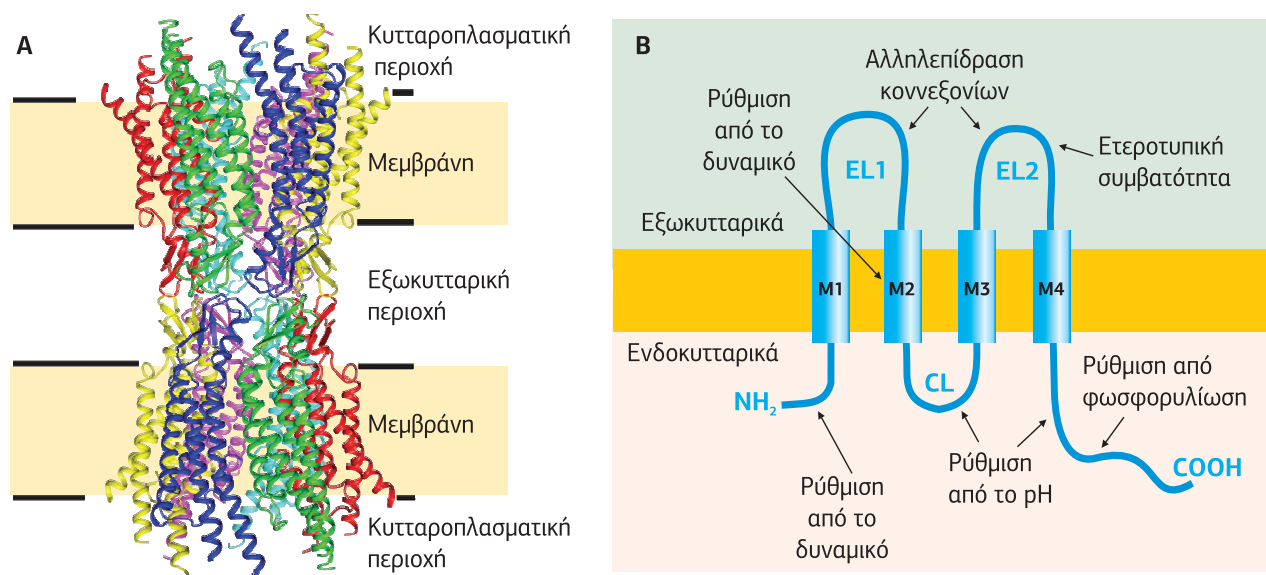
Α. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι διακυτταρικά κανάλια ανάμεσα σε παρακείμενα κύτταρα. Δημιουργούνται με την ένωση δύο κυτταρικών ημιδιαύλων-κοννεξονίων, αφήνοντας ένα διακυτταρικό χάσμα 3,5 nm. Η φυσιολογική διακυτταρική απόσταση είναι 20 nm. Β. Κάθε κοννεξόνιο σχηματίζεται από 6 πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις κοννεξίνες, οι οποίες δημιουργούν έναν κεντρικό πόρο. Η αλλαγή της διαμόρφωσης των κοννεξινών ανοίγει ή κλείνει το κανάλι. [30]

το θέμα της αλληλοεπικάλυψης του ρόλου τους. Σήμερα γνωρίζουμε ότι και οι δύο τύποι συμβάλλουν στη διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων σε ιστούς, όπως το ΚΝΣ, ενώ οι παννεξίνες συγκροτούν κυρίως ημιδιαύλους, από τους οποίους απελευθερώνεται ATP, συμβάλλοντας έτσι στην παρακρινή επικοινωνία, η οποία θεωρούνταν δράση των ημιδιαύλων κοννεξινών.

Κάθε **κοννεξίνη** (ιννεξίνη ή παννεξίνη) διαπερνά τη μεμβράνη τέσσερις φορές (περιοχές M1-M4) υπό μορφή α-έλικας και έχει το NH₂-τελικό και το COOH-τελικό άκρο της προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος. Ο κάθε εξωκυτταρικός βρόχος περιέχει καλά συντηρημένες κυστεΐνες (τρεις στις κοννεξίνες, δύο στις ιννεξίνες και τις παννεξίνες), οι οποίες δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς με τις κυστεΐνες των κοννεξινών του άλλου κυττάρου για τη δημιουργία του χασμοσυνδέσμου (**Εικόνα 2.4**).

**Εικόνα 2.4**

Η οικογένεια των πρωτεϊνών που δημιουργούν τους χασμοσυνδέσμους. Η κάθε κοννεξίνη (ιννεξίνη ή παννεξίνη) αποτελείται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές, δύο εξωκυτταρικούς βρόχους (EL1, EL2), που περιέχουν τρεις ή δύο καλά συντηρημένες Cys (C), έναν ενδοκυτταρικό βρόχο, ένα NH₂-τελικό άκρο και ένα COOH-τελικό που βρίσκονται ενδοκυτταρικά. Ειδικά στις παννεξίνες βρέθηκε ότι ο εξωκυτταρικός τους βρόχος περιέχει και μια θέση γλυκοσυλίνωσης (Asn254), που συμμετέχει στη σύνδεση μεταξύ των παννεξινών των παρακείμενων κυττάρων. [17]



Εικόνα 2.5

A. Τριδιάστατη αναπαράσταση του χασμοσυνδέσμου της Cx26. Το κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει μια κοννεξίνη. [37] B. Η κοννεξίνη είναι μονομερής πρωτεΐνη που διαπερνά τη μεμβράνη τέσσερις φορές (περιοχές M1-M4) και έχει το NH₂-τελικό και COOH-τελικό άκρο της προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος. Οι εξωκυτταρικοί βρόχοι (EL1, EL2) είναι υπεύθυνοι για την αλληλεπίδραση με την κοννεξίνη του γειτονικού κυττάρου. Ο ενδοκυτταρικός βρόχος (CL) ελέγχει την αγωγιμότητα του καναλιού έπειτα από αλλαγές στο pH, το COOH-τελικό άκρο έπειτα από φωσφορυλίωση, ενώ το NH₂-τελικό άκρο έπειτα από αλλαγές του δυναμικού. [46]

Οι εξωκυτταρικοί βρόχοι και οι διαμεμβρανικές α-έλικες εμφανίζουν συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων, ενώ ο κυτταροπλασματικός βρόχος και η COOH-τελική περιοχή παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και ρυθμίζουν την αγωγιμότητα των χασμοσυνδέσμων και τη διαπερατότητά τους σε μεταβολίτες, κάτω από την επίδραση του pH, της τάσης ή της φωσφορυλίωσης (**Εικόνα 2.5**).

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 20 διαφορετικά είδη κοννεξινών στα ποντίκια και 21 στον άνθρωπο, με διαφορετικές φυσιολογικές ιδιότητες και μηχανισμούς ρύθμισης. Κατατάσσονται σε 5 ομάδες (α, β, γ, δ, ε) ανάλογα με το ποσοστό της ομολογίας τους και το μήκος του κυτταροπλασματικού τους βρόχου. Η γενική ονομασία τους είναι CxN, όπου N είναι το MB της κοννεξίνης.

Ομάδα α: Cx37, Cx40, Cx43, Cx46, Cx50, Cx59, Cx62

Ομάδα β: Cx25, Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx32

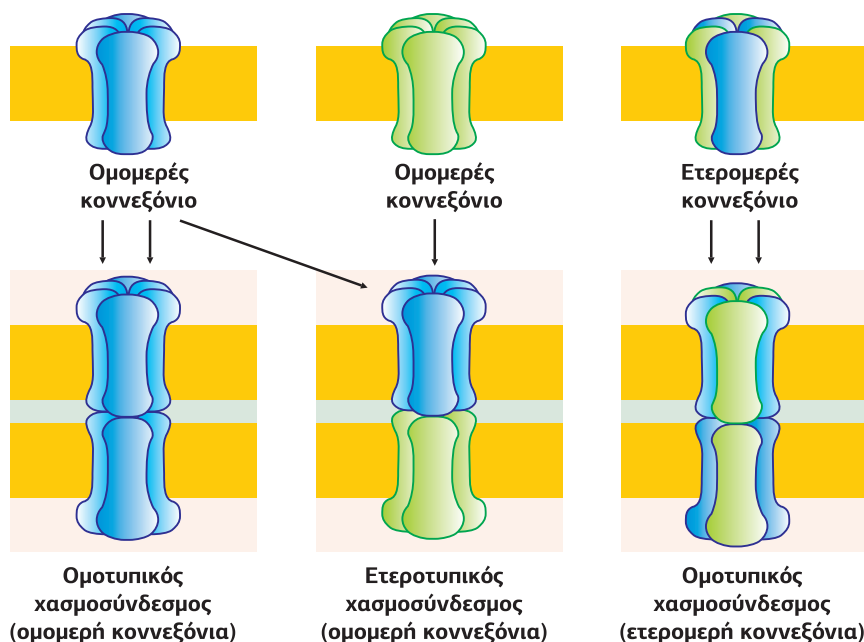
Ομάδα γ: Cx30.2, Cx45, Cx47

Ομάδα δ: Cx31.9, Cx36, Cx40.1

Ομάδα ε: Cx23

Κάθε κοννεξίνη εκφράζεται σε συγκεκριμένο ιστό και κυτταρικό τύπο. Ωστόσο, πολλοί κυτταρικοί τύποι εκφράζουν πολλών ειδών κοννεξίνες και έτσι σχηματίζονται ομοτυπικά και ετεροτυπικά κανάλια με ομομερή ή ετερομερή κοννεξόνια. Οι **ομοτυπικοί** χασμοσύνδεσμοι αποτελούνται από δύο όμοια μεταξύ τους κοννεξόνια. Οι **ετεροτυπικοί** χασμοσύνδεσμοι αποτελούνται από δύο διαφορετικά μεταξύ τους κοννεξόνια. Τα κοννεξόνια μπορεί να είναι **ομομερή**, όταν αποτελούνται από ένα είδος κοννεξινών, ή **ετερομερή**, όταν αποτελούνται από διαφορετικά είδη (**Εικόνα 2.6**). Ωστόσο, ετερομερή κοννεξόνια δημιουργούνται μόνο εάν οι κοννεξίνες είναι συμβατές μεταξύ τους. Για παράδειγμα, δεν σχηματίζονται ετερομερή κοννεξόνια με Cx43 και Cx26.

Το είδος των κοννεξινών που δημιουργούν ένα κοννεξόνιο, και κατ' επέκταση έναν χασμοσύνδεσμο, επηρεάζει τη διαπερατότητα του χασμοσυνδέσμου σε σχέση με το φορτίο και το μέγεθος των μορίων τα οποία μεταφέρει. Για παράδειγμα, η Cx43 επιτρέπει τη διάχυση σχετικά μεγάλων σηματοδοτικών μορίων < 1,2 kDa, με προτίμηση τα αρνητικά φορτισμένα μόρια, ενώ η Cx45 δημιουργεί μικρότερο πόρο, επιτρέποντας διάχυση μορίων < 0,3 kDa με προτίμηση τα θετικά φορτισμένα μόρια. Κατά συνέπεια, η δημιουργία ετεροτυπικών χασμοσυνδέσμων προσδίδει στο σύστημα μεγάλη πλαστικότητα.

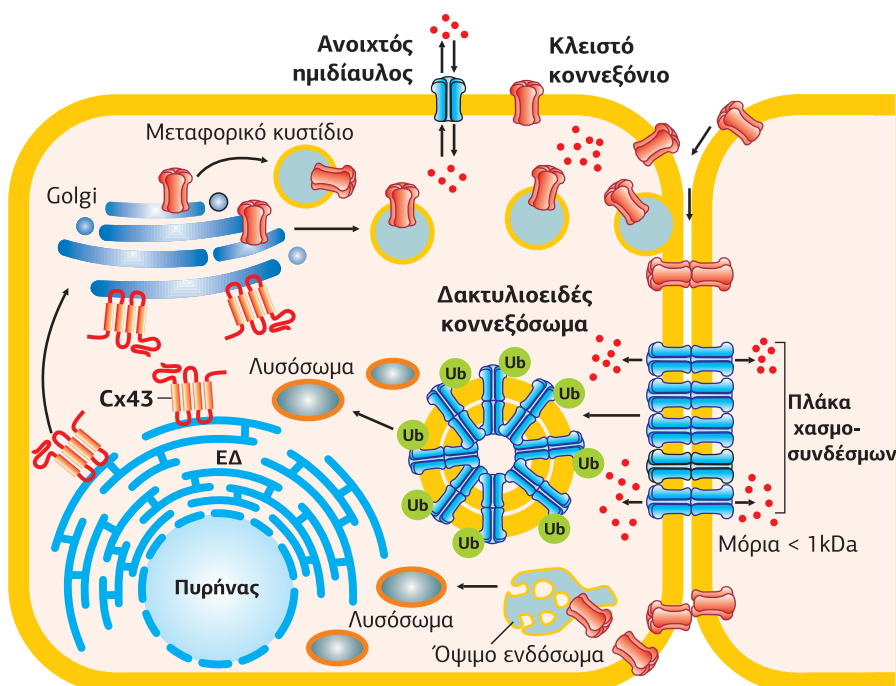
**Εικόνα 2.6**

Οι χασμοσύνδεσμοι μπορεί να είναι ομοτυπικοί ή ετεροτυπικοί, με ομομερή ή ετερομερή κοννεξόνια. Όταν τα κοννεξόνια αποτελούνται από ένα είδος κοννεξινών, ονομάζονται ομομερή, ενώ όταν αποτελούνται από διαφορετικά είδη, ετερομερή. Ομοτυπικοί ονομάζονται οι χασμοσύνδεσμοι που αποτελούνται από δύο όμοια μεταξύ τους κοννεξόνια (ομομερή ή ετερομερή), ενώ ετεροτυπικοί από δύο διαφορετικά μεταξύ τους κοννεξόνια. [17]

1.3

Σύνθεση και ανακύκλωση των χασμοσυνδέσμων

Οι κοννεξίνες συντίθενται στο αδρό ΕΔ, μεταφέρονται στο σύστημα Golgi, όπου ολιγομερίζονται για να δημιουργήσουν τα κοννεξόνια, τα οποία, στη συνέχεια, οδηγούνται στην πλασματική μεμβράνη. Εκεί ενώνονται με τα κοννεξόνια του γειτονικού κυττάρου δημιουργώντας τις πλάκες των χασμοσυνδέσμων. Ωστόσο, ορισμένες κοννεξίνες, όπως η Cx26, μπορεί να μην περάσουν καθόλου από το Golgi (διότι δεν χρειάζεται να γλυκοσυλιωθούν), αλλά ολιγομερίζονται στο ΕΔ και έπειτα μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη. Οι νεοσυντιθέμενοι ημιδιαύλοι, οι οποίοι μεταφέρονται στη μεμβράνη, μέχρι να συνδεθούν με τους ημιδιαύλους του γειτονικού κυττάρου ώστε να σχηματίσουν ένα διακυτταρικό κανάλι, παραμένουν κλειστοί.

**Εικόνα 2.7**

Σύνθεση και αποικοδόμηση των κοννεξινών

Οι κοννεξίνες παράγονται στο αδρό ΕΔ, ολιγομερίζονται στη συσκευή Golgi και σχηματίζουν τα κοννεξόνια, τα οποία μεταφέρονται με μεταφορικά κυστίδια στην πλασματική μεμβράνη, όπου σχηματίζουν τις πλάκες χασμοσυνδέσμων. Καθώς ο χρόνος ημιζωής των κοννεξινών είναι μικρός, οι χασμοσύνδεσμοι φωσφορυλιώνονται από την κινάση CDK1 ή την PKC και γίνονται στόχος για ουβικουτίνωση. Τμήματα της μεμβράνης που περιέχει τους ουβικουτινωμένους χασμοσυνδέσμους εγκολώνονται σχηματίζοντας δακτυλιοειδή κοννεξοσώματα, τα οποία αποικοδομούνται είτε μέσω λυσοσωμάτων είτε στα πρωτεασώματα. [42]

Εικόνα 2.8

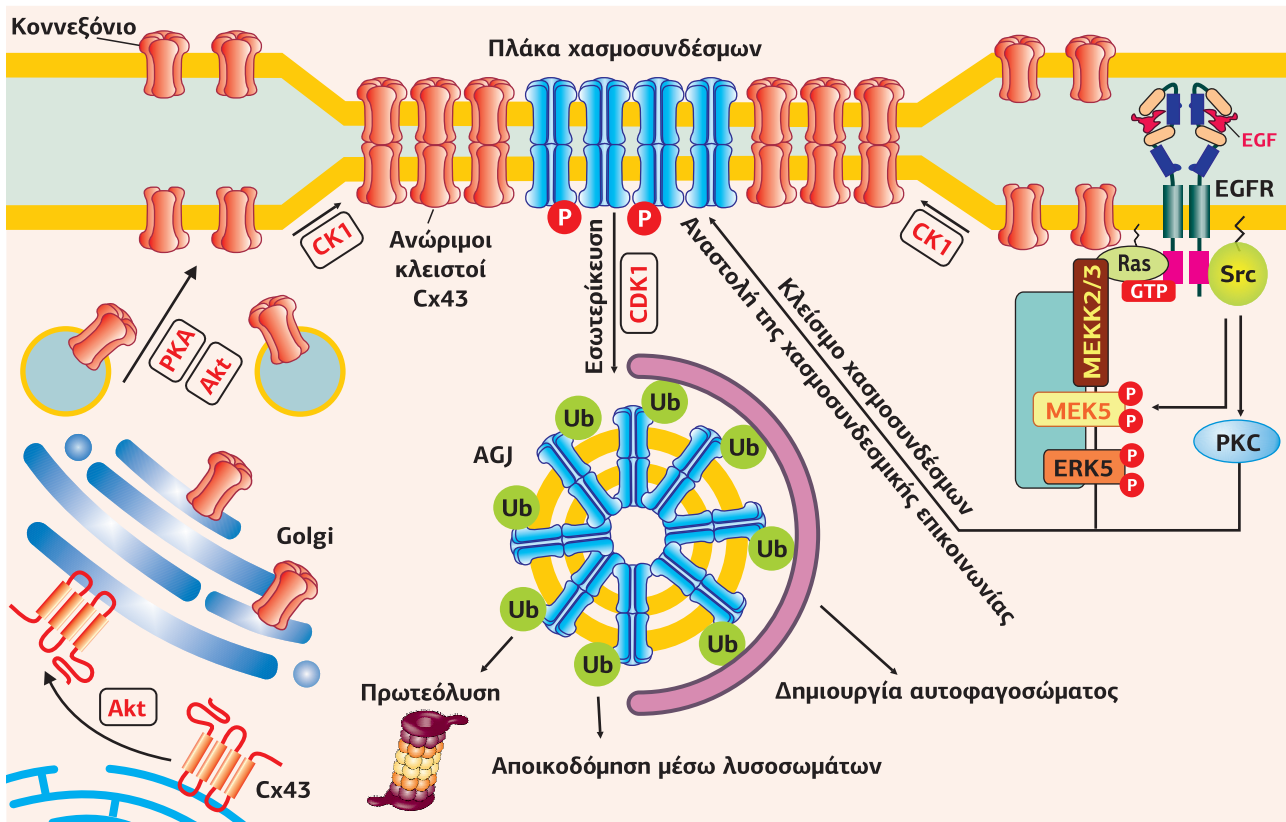
Κινάσες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κύκλου ζωής της Cx43. Η μεταφορά των μονομερών Cx43 από το ΕΔ στη συσκευή Golgi ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση Akt. Η μεταφορά των κοννεξονίων προς την πλασματική μεμβράνη ρυθμίζεται από την πρωτεϊνική κινάση A, PKA, ενώ η δημιουργία πλακών χασμοσυνδέσμων στη μεμβράνη από την κινάση της καζεΐνης CK1. Η κινάση CDK1 φωσφορυλιώνει τις Cx43 στην αρχή της μίτωσης, οδηγώντας στην εσωτερίκυνση των χασμοσυνδέσμων μέσω των δακτυλιοειδών κοννεξοσωμάτων (annular GJs, AGJs) και στην αποικοδόμησή τους μέσω λυσοσωμάτων ή μέσω πρωτεόλυσης. Οι κινάσες Src, PKC και MAPKs (MEK2/3 - MEK5 - ERK5) οδηγούν στο κλείσιμο των χασμοσυνδέσμων και στην αναστολή της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας. Οι κινάσες αυτές μπορεί να ενεργοποιηθούν έπειτα από ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (π.χ. EGFR), ενώ η PKC μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα από τους φορβολεστέρες (TPA). [53]

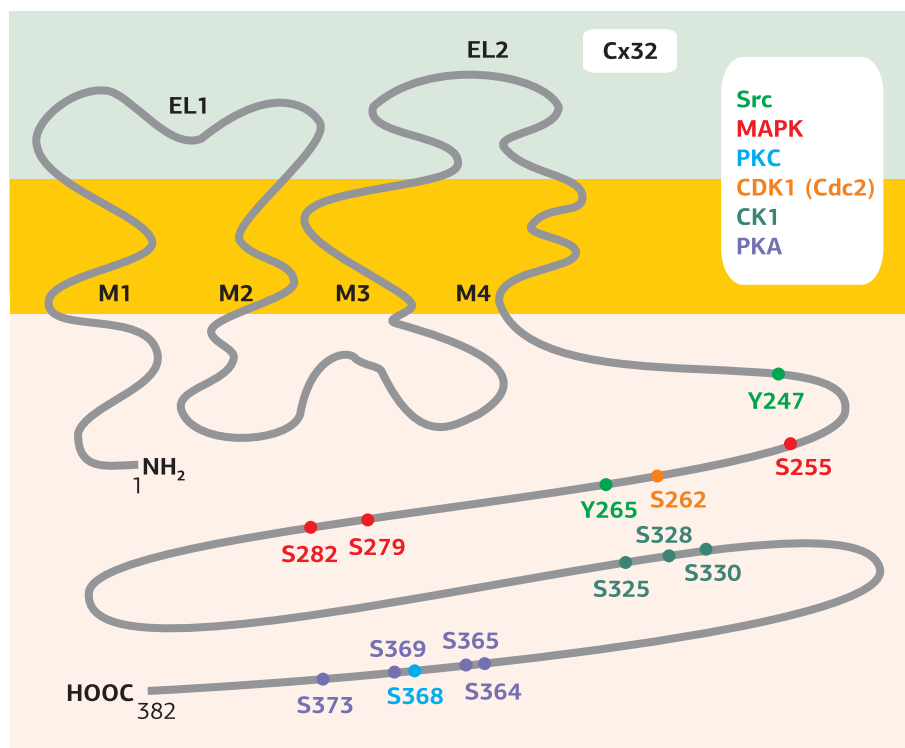
Οι πλάκες χασμοσυνδέσμων είναι εξαιρετικά δυναμικές περιοχές της μεμβράνης, αυξάνονται σε μέγεθος από την παράθεση των νέων κοννεξονίων στην περιφέρειά τους, και αποικοδομούνται γρήγορα καθώς η ανακύκλωση (turnover) των κοννεξινών είναι εξαιρετικά γρήγορη. Για παράδειγμα, στην καρδιά οι κοννεξίνες έχουν ημιζωή 1-3 ώρες, ενώ στις ίνες του φακού είναι πιο σταθερές με διάρκεια ημιζωής 2-3 ημέρες. Λόγω της σύντομης ημιζωής των κοννεξινών τα νεοσυντιθέμενα κοννεξόνια προστίθενται στην περιφέρεια των πλακών και ταυτόχρονα τα παλιά απομακρύνονται από το κέντρο τους. Αυτή η ανακύκλωση περιλαμβάνει την εγκόλπωση μιας περιοχής της πλάκας σε ένα κυστίδιο, που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα του ενός κυττάρου, με τη μορφή **δακτυλιοειδούς κοννεξοσωμάτος** (annular connexosome), το οποίο αποικοδομείται μέσω λυσοσωμάτων ή πρωτεόλυσης (**Εικόνα 2.7**).

1.4 | Ρύθμιση της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας

Η επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων (GJIC: Gap Junctional Intercellular Communication) ρυθμίζεται από την τάση, την ενδοκυτταρική συγκέντρωση $[H^+]_i$, δηλαδή το pH, τα ιόντα Ca^{2+} και το επίπεδο φωσφορυλίωσης των κοννεξινών.

Η φωσφορυλίωση φαίνεται να παίζει τον σημαντικότερο ρόλο. Τουλάχιστον 8 κινάσες, κυρίως η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), και τρεις φωσφατάσες ελέγχουν φυσιολογικά τις πολυάριθμες κοννεξίνες. Η φωσφορυλίωση κοννεξινών συχνά συνδέεται με αλλαγές στην αγωγιμότητα, τη διαπερατότητα και/ή το άνοιγμα/κλείσιμο των χασμοσυνδέσμων, και ποικίλλει ανάλογα με την ισομορφή της κοννεξίνης. Επίσης, επηρεάζει σχεδόν όλα τα στάδια του κύκλου ζωής των χασμοσυνδέσμων, τον ολιγομερισμό των κοννεξινών, τη μεταφορά από το ΕΔ στο Golgi και από εκεί στην πλασματική μεμβράνη, όπως επίσης τον σχηματι-



**Εικόνα 2.9****Θέσεις φωσφορυλίωσης στην**

κοννεξίνη Cx32. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης είναι τυροσίνες (Y) και σερίνες (S) του COOH-τελικού ενδοκυτταρικού άκρου. Κάθε κινάση φωσφορυλιώνει διαφορετικά κατάλοιπα αμινοξέων επιφέροντας διαφορετικά αποτελέσματα. [35]

σμό των χασμοσυνδεσμικών πλακών, την εσωτερίκευσή τους και τέλος την αποικοδόμησή τους (Εικόνα 2.8). Συνεπώς, η φωσφορυλίωση μπορεί να συνεισφέρει στη ρύθμιση της ημιζωής των κοννεξινών.

Η κύρια θέση φωσφορυλίωσης των κοννεξινών είναι το COOH-τελικό ενδοκυτταρικό τους άκρο, ενώ δεν έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση στο NH₂-τελικό άκρο, σε κανένα είδος κοννεξίνης (Εικόνα 2.9). Η φωσφορυλίωση δεν έχει πάντα το ίδιο αποτέλεσμα. Για παράδειγμα:

- Η αύξηση του ενδοκυτταρικού cAMP, που προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης PKA, οδηγεί στην αύξηση της φωσφορυλίωσης των Cx32, με αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης και μεταφοράς των κοννεξονίων στην πλάσματική μεμβράνη και, κατά συνέπεια, την αύξηση του αριθμού των χασμοσυνδέσμων.
- Παρόμοιο ρόλο με την κινάση PKA παίζει και η κινάση της καζεΐνης CK1.
- Η ενεργοποίηση της κινάσης PKC (είτε μέσω υποδοχέων αυξητικών παραγόντων είτε άμεσα από τους φορβολεστέρες-TPA) έχει τα αντίθετα αποτελέσματα: ελαττωμένη χασμοσυνδεσμική επικοινωνία. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα διαφορετικά κατάλοιπα που φωσφορυλιώνει η PKC. Γνωρίζοντας την καρκινογόνο δράση των φορβολεστέρων και το γεγονός ότι σε καρκινικά κύτταρα έχει βρεθεί άναρχη χασμοσυνδεσμική επικοινωνία, θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι η ελαττωμένη χασμοσυνδεσμική επικοινωνία στα καρκινικά κύτταρα είναι ένα κρίσιμο βήμα για την καρκινογένεση.
- Η πρωτεϊνική κινάση G (PKG, cGMP dependent kinase) και οι MAPKs MEKK2/MEK/ERK5 φωσφορυλιώνουν την Cx32 και ελαττώνουν τη χασμοσυνδεσμική επικοινωνία. Επιπλέον, η κινάση CDK1 (Cdc2, Cell division cycle protein 2), η οποία είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, φωσφορυλιώνει τις κοννεξίνες Cx32 οδηγώντας στην εσωτερίκευση και στη συνέχεια στην αποικοδόμηση των χασμοσυνδέσμων κατά τη μίτωση.
- Η φωσφορυλίωση των κοννεξινών σε κατάλοιπα τυροσίνης από την κινάση v-Src οδηγεί σε χάσιμο της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας.

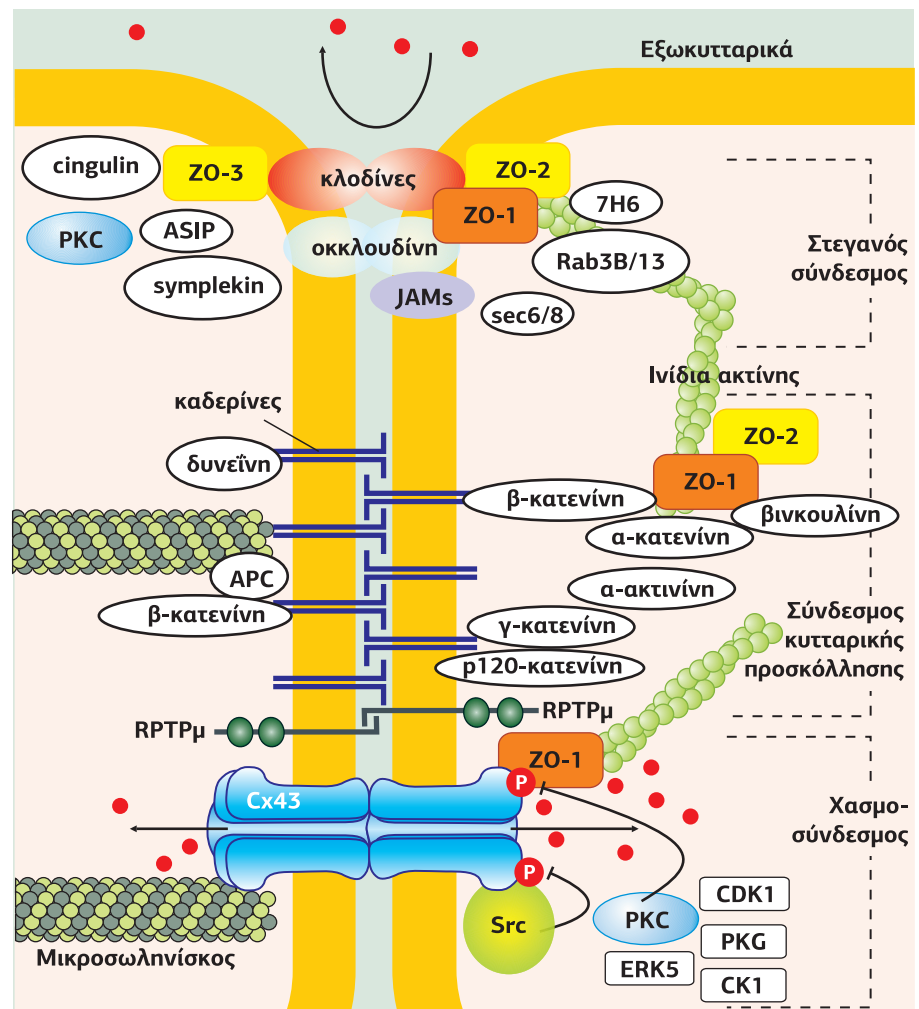
2. Το πρωτεϊνικό πλέγμα των χασμοσυνδέσμων (nexus)

Οι κόννεξινες των χασμοσυνδέσμων αλληλεπιδρούν με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών σχηματίζοντας ένα **πλέγμα χασμοσυνδέσμων** (nexus), το οποίο αλλάζει σε απάντηση ενδοκυτταρικών αλλαγών, αποδεικνύοντας ότι είναι μια δυναμική δομή που μεταβάλλεται σύμφωνα με τις κυτταρικές ανάγκες. Γενικά θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε το πλέγμα των χασμοσυνδέσμων ως ένα συντονισμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-κόννεξινών που αλλάζει από λεπτό σε λεπτό σύμφωνα με τις ανάγκες των κυττάρων.

Το πρωτεϊνικό πλέγμα των χασμοσυνδέσμων (nexus) σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση των κόννεξινών με άλλες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων (**Εικόνα 2.10**):

1. Πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων (tight junctions), όπως οι ZO-1 και ZO-2 (Zonula Occludens, το λατινικό όνομα για τους στεγανούς συνδέσμους) και οι κλοδίνες και οκκλουδίνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα μέσω συνδεδεμένων πρωτεϊνών τους.
2. Πρωτεΐνες των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης (adherens junctions), όπως η α - και β -κατενίνη, και του κυτταροσκελετού, όπως η α - και β -σωληνίνη των μικροσωληνίσκων.
3. Κινάσες και φωσφατάσες τυροσίνης, όπως η κινάση Src (η κυτταρική c-Src και η ιική v-Src) και η διαμεμβρανική φωσφατάση RPTPμ (Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase).

Εικόνα 2.10
Σχηματική απεικόνιση του πρωτεϊνικού πλέγματος των χασμοσυνδέσμων (nexus). Στην εικόνα παρατηρούμε ότι η κόννεξίνη 43 αλληλεπιδρά με πολλά είδη πρωτεϊνών: με πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων, όπως η ZO-1, ZO-2 και ZO-3 η οκκλουδίνη και οι κλοδίνες, με πρωτεΐνες των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης, όπως οι καδερίνες, οι κατενίνες (α , β , γ και p120), με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως τα ινίδια ακτίνης, με τη φωσφατάση τυροσίνης RPTPμ, και με κινάσες, όπως οι Src, PKC, PKG, ERK5, CK1 (κινάση της καζεΐνης) και CDK1. [22]

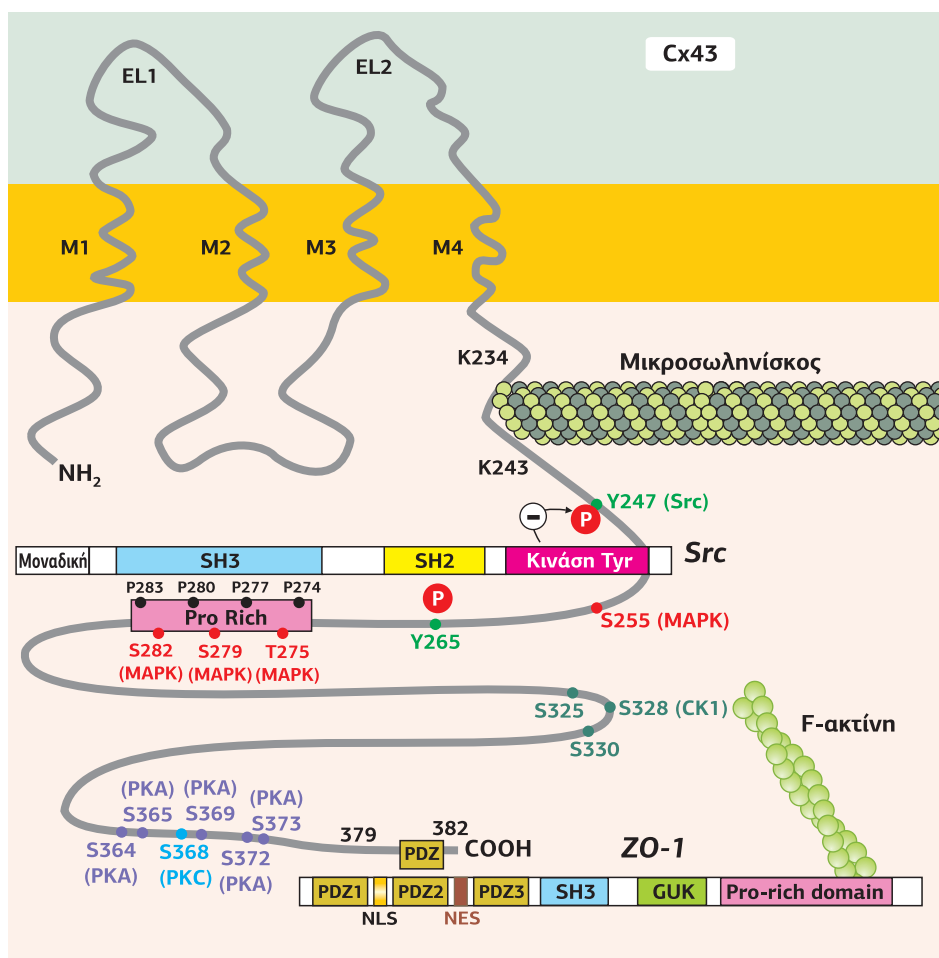


2.1

Πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων

α. Zonula Occludens (ZO-1): Η ZO-1 είναι η πρώτη πρωτεΐνη από αυτές που συμμετέχουν στον σχηματισμό των στεγανών συνδέσμων που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με κοννεξίνες. Είναι μια πολύ μεγάλη πρωτεΐνη (220 kDa), σχεδόν στο μέγεθος ενός κοννεξονίου, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των χασμοσυνδέσμων. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinases), πρωτεΐνες σκαλωσιές που βοηθούν τη δημιουργία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων στην πλασματική μεμβράνη, μέσω των πολλών περιοχών αλληλεπίδρασης που περιέχουν. Η ZO-1 περιέχει 3 περιοχές PDZ, μια περιοχή SH3, μια ανενεργή περιοχή γουανυλικής κινάσης GUK (Guanylate Kinase) και αρκετές περιοχές εντοπισμού στον πυρήνα NLS (Nuclear Localization Sequence) και NES (Nuclear Export Signal). Αλληλεπιδρά με αρκετές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε κυτταρικές συνδέσεις, μεταξύ των οποίων και με κοννεξίνες. Η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω της PDZ2 περιοχής της ZO-1 και της PDZ περιοχής του COOH-τελικού άκρου των κοννεξινών, ενώ μέσω της πλούσιας σε προλίνη περιοχής της αλληλεπιδρά με την F-ακτίνη (**Εικόνα 2.11**). Η ZO-1 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με όλες τις κοννεξίνες.

Η αλληλεπίδραση της ZO-1 με τις κοννεξίνες α. λειτουργεί ως πλαίσιο στήριξης για άλλες πρωτεΐνες, βοηθώντας να έρθουν σε επαφή με άλλες κοννεξίνες ή με ουσίες που μεταφέρονται διαμέσου των χασμοσυνδέσμων, και β. συμμετέχει στη δημιουργία, κατανομή και ανακύκλωση των χασμοσυνδέσμων. Για παράδειγμα, όταν η Cx43 είναι ανίκανη να συνδεθεί με τη ZO-1, έχει βραχύτερο χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με την αγρίου τύπου Cx43, ικανή να συνδέεται με τη ZO-1 (2 ώρες έναντι 3-5 ώρες, αντίστοιχα). Το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες ZO έχουν περιοχές NLS



Εικόνα 2.11

Η αλληλουχία της ανθρώπινης κοννεξίνης 43 και οι θέσεις αλληλεπίδρασής της στο COOH-τελικό άκρο με άλλες πρωτεΐνες. Μέσω της περιοχής πλούσιας σε προλίνη (PRD) η Cx43 αλληλεπιδρά με την περιοχή SH3 της κινάσης τυροσίνης Src, μέσω της φωσφορυλιωμένης τυροσίνης Y265 με την περιοχή SH2 της Src και μέσω της PDZ περιοχής του COOH-τελικού άκρου με την περιοχή PDZ της ZO-1. Διακρίνεται, επίσης, και η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων. [22]

τους επιτρέπει τη μετακίνηση ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, όπου μπορούν να μεταφέρουν σήματα και να μεταβάλουν την έκφραση γονιδίων και την κυτταρική συμπεριφορά.

β. Οκκλουδίνες (occludins) και κλοδίνες (claudins): Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων, παρόμοιας δομής με τις κοννεξίνες, έχουν δύο βρόχους στην εξωκυτταρική πλευρά και το NH₂-τελικό, το COOH-τελικό άκρο και έναν βρόχο στην κυτταροπλασματική πλευρά. Αλληλεπιδρούν με τις κοννεξίνες ανάλογα με τον ιστό, για παράδειγμα η κλοδίνη-1 αλληλεπιδρά με την κοννεξίνη 32 στα ηπατοκύτταρα, ενώ στα αστροκύτταρα παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της κλοδίνης-1 με την κοννεξίνη 43. Έχει βρεθεί ότι οι χασμοσύνδεσμοι μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών των στεγανών συνδέσμων.

2.2

Πρωτεΐνες των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης και του κυτταροσκελετού

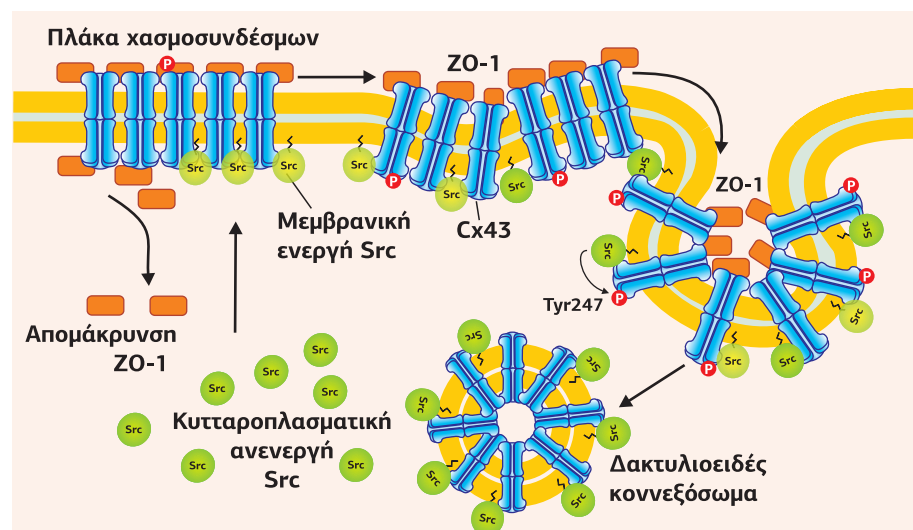
Οι κοννεξίνες αλληλεπιδρούν, επίσης, και με πρωτεΐνες των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης, οι οποίες χρησιμεύουν στη μηχανική στήριξη παρακείμενων κυττάρων και στην πολικότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση της Cx43 με τη β-κατενίνη σε κύτταρα του καρδιακού μυός φαίνεται να επηρεάζει τον ολιγομερισμό της Cx43 και τη μεταφορά των χασμοσυνδέσμων στη μεμβράνη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι up-regulation της E-καδερίνης αυξάνει τη χασμοσυνδεσμική επικοινωνία.

Σε ό,τι αφορά πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, βρέθηκε ότι υπάρχει συνεντοπισμός και λειτουργική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις κοννεξίνες (κυρίως την Cx43) και την ακτίνη, μυοσίνη, α/β-σωληνίνη, βιμεντίνη, σπεκτρίνη, καθώς και άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό. Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την ενδοκυτταρική μεταφορά των κοννεξινών και την ενσωμάτωσή τους στην πλασματική μεμβράνη, καθώς πολλά κυστίδια που μεταφέρουν κοννεξίνες ακολουθούν τις διαδρομές των μικροσωληνίσκων για να προσεγγίσουν τη μεμβράνη. Επίσης, το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων αλληλεπιδρούν και με πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων επιτρέπει την εξειδικευμένη στόχευση των κοννεξινών σε περιοχές της μεμβράνης κοντά σε στεγανούς συνδέσμους. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις κοννεξίνες και στα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού καθώς και των συνδεδεμένων πρωτεϊνών σταθεροποιούν τους χασμοσυνδέσμους στη μεμβράνη.

Εικόνα 2.12

Ο ρόλος της κινάσης Tyr Src στην εσωτερίκευση των χασμοσυνδέσμων (Cx43).

Οι Cx43, στις πλάκες χασμοσυνδέσμων, βρίσκονται συνδεδεμένες με τις πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσμων ZO-1, οι οποίες σταθεροποιούν τη θέση των χασμοσυνδέσμων στη μεμβράνη. Σε κύτταρα, τα οποία εκθέτονται σε ένα ισχυρό καρκινογόνο, η εσωτερίκευση των χασμοσυνδέσμων αυξάνεται, όπως θα αναμενόταν, καθώς στους περισσότερους τύπους καρκινικών κυττάρων η εσωτερίκευση των Cx43 διαταράσσεται. Το καρκινογόνο προκαλεί την άμεση στρατολόγηση της Src στη μεμβράνη (μέσα σε 3 min) καθώς και τη φυσική αλληλεπίδραση της Src με τις Cx43, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την αλληλεπίδραση της ZO-1 με τις Cx43, με αποτέλεσμα την αύξηση της εσωτερίκευσής τους. [23]



2.3 | Κινάσες και φωσφατάσες τυροσίνης

Είδαμε ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, και κυρίως η φωσφορυλίωση, μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των κοννεξινών. Ορισμένες κινάσες, όπως οι Src κινάσες, οι οποίες περιέχουν περιοχές SH3, αλληλεπιδρούν με περιοχές πλούσιες σε προλίνη του COOH-τελικού άκρου της Cx43. Επιπλέον, η Src μέσω της περιοχής SH2 αλληλεπιδρά και με συγκεκριμένα κατάλοιπα Tyr, και πάλι του COOH-τελικού άκρου, όπως Y265, Y267, όταν αυτά φωσφορυλιωθούν (βλ. **Εικόνα 2.11**). Η αλληλεπίδραση της Cx43 με την Src ανταγωνίζεται την αλληλεπίδραση της κοννεξίνης με την ZO-1, καθώς η ZO-1 αποσυνδέεται άμεσα από το σύμπλεγμα, οδηγώντας στην εσωτερίκευση της πλάκας των χασμοσυνδέσμων με τη δημιουργία των δακτυλιοειδών κοννεξοσωμάτων (**Εικόνα 2.12**). Αναστολή της φωσφατάσης τυροσίνης RPTPμ (Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase) έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της Cx43 και το κλείσιμο των χασμοσυνδέσμων. Κατά συνέπεια, η RPTPμ φαίνεται να αντισταθμίζει τη δράση της Src διατηρώντας την Cx43 στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της.

2.4 | Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με κοννεξίνες

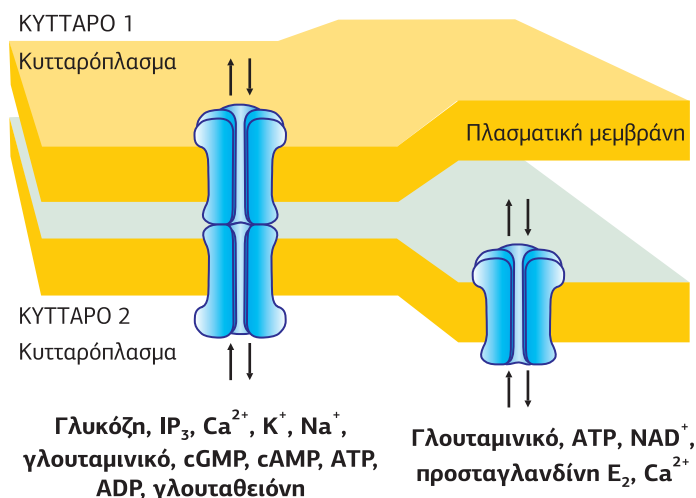
Μεταξύ των πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί πρόσφατα να αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με κοννεξίνες συμπεριλαμβάνονται κανάλια ιόντων, μεμβρανικοί μεταφορείς και υποδοχείς, όπως για παράδειγμα οι χολινεργικοί υποδοχείς. Επίσης, πολλές κοννεξίνες έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν με την καλμοδουλίνη, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαπερατότητας των χασμοσυνδέσμων. Τέλος, η κοννεξίνη Cx36 συνδέεται με την Ca^{2+} /καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση (CaMK-II) στα νευρικά κύτταρα, ρυθμίζοντας την ηλεκτρική διαβίβαση μεταξύ των νευρικών συνάψεων.

Σε αμυδρό φως, η ενεργοποίηση των αμακρινών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς από το Glu αυξάνει την είσοδο Ca^{2+} μέσω των NMDA-Rs, ενεργοποιείται η CaMK-II, η οποία φωσφορυλιώνει τους χασμοσυνδέσμους Cx36 αυξάνοντας την αγωγιμότητά τους.

Σε μεγάλη ένταση φωτός, ενεργοποιείται η φωσφατάση PP2A, η οποία αποφωσφορυλιώνει τις Cx36 με αποτέλεσμα το κλείσιμο των χασμοσυνδέσμων. Βλ. σελ. 94 και Εικόνα 2.32.

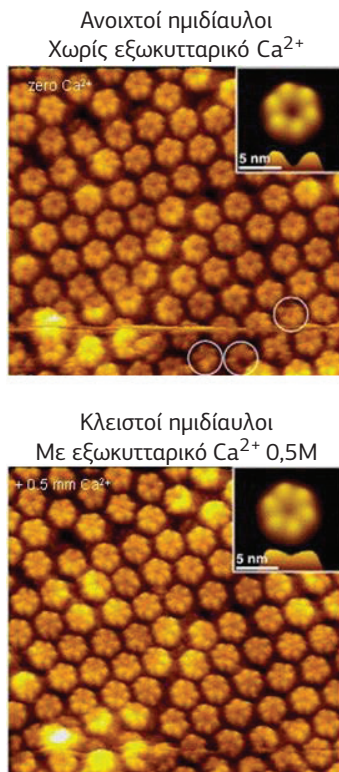
3. Οι ημιδιάυλοι μπορεί να είναι λειτουργικοί, κάτω από ορισμένες συνθήκες

Για μεγάλο χρονικό διάστημα η κύρια λειτουργία που αποδιδόταν στους ημιδιάυλους ήταν η συγκρότηση των χασμοσυνδέσμων (**Εικόνα 2.13**). Ωστόσο, στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ο David Paul στο Harvard εντόπισε με πρωτοποριακές μελέτες τα πρώτα ρεύματα τα οποία προκαλούνται από ημιδιάυλους σε ωκύτταρα *Xenopus* που εκφράζουν κοννεξίνη 46 (Cx46). Παρατήρησε ότι η υπερέκφραση της



Εικόνα 2.13

Οι ημιδιάυλοι δεν έχουν ως μοναδικό ρόλο τη συγκρότηση των χασμοσυνδέσμων, αλλά μπορούν να ανοίξουν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Έχει βρεθεί ότι μέσω των ημιδιαύλων μεταφέρονται κυρίως γλουταμινικό, ATP, NAD^+ , προσταγλανδίνη E_2 και Ca^{2+} . [44]

**Εικόνα 2.14**

Σε χαμηλά εξωκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} οι ημιδιάυλοι ανοίγουν. [52]

Εικόνα 2.15

Ημιδιάυλοι κοινεξίνης (HCs) σε απάντηση σε φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα ανοίγουν και απελευθερώνουν Ca^{2+} , ATP, προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2) και NAD^+ , τα οποία δρουν με παρακρινή ή αυτοκρινή τρόπο. [11]

Cx46 οδηγούσε σε λύση των ωοκυττάρων και έτσι το άνοιγμα ημιδιαύλων θεωρήθηκε ότι είναι ασύμβατο με την κυτταρική ζωή. Κατά συνέπεια, επικράτησε η άποψη ότι το άνοιγμα των ημιδιαύλων προκαλεί τον θάνατο των κυττάρων εξαιτίας της απώλειας μεταβολιτών, πτώσης συγκέντρωσης ιόντων και εκροής Ca^{2+} . Στα τέλη της δεκαετίας του 1990 διάφορες ερευνητικές ομάδες έδειξαν ότι το άνοιγμα ημιδιαύλων συμβαίνει κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες, όπως χαμηλά εξωκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} (**Εικόνα 2.14**), αναστολή του μεταβολισμού (ισχαιμία, υποξία), μηχανική διέγερση, εκπόλωση του κυττάρου ή χαμηλό ενδοκυτταρικό pH, οδηγώντας στον θάνατο του κυττάρου.

Επί του παρόντος, τα περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ημιδιάυλοι έχουν χαμηλή δραστηριότητα, η οποία όμως είναι επαρκής για να εξασφαλίσει την απελευθέρωση στον εξωκυτταρικό χώρο σηματοδοτικών μορίων, όπως ATP, προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2), γλουταμινικό, αδενοσίνη και NAD^+ , τα οποία εκτελούν παρακρινή ή αυτοκρινή σηματοδότηση (**Εικόνα 2.15**).

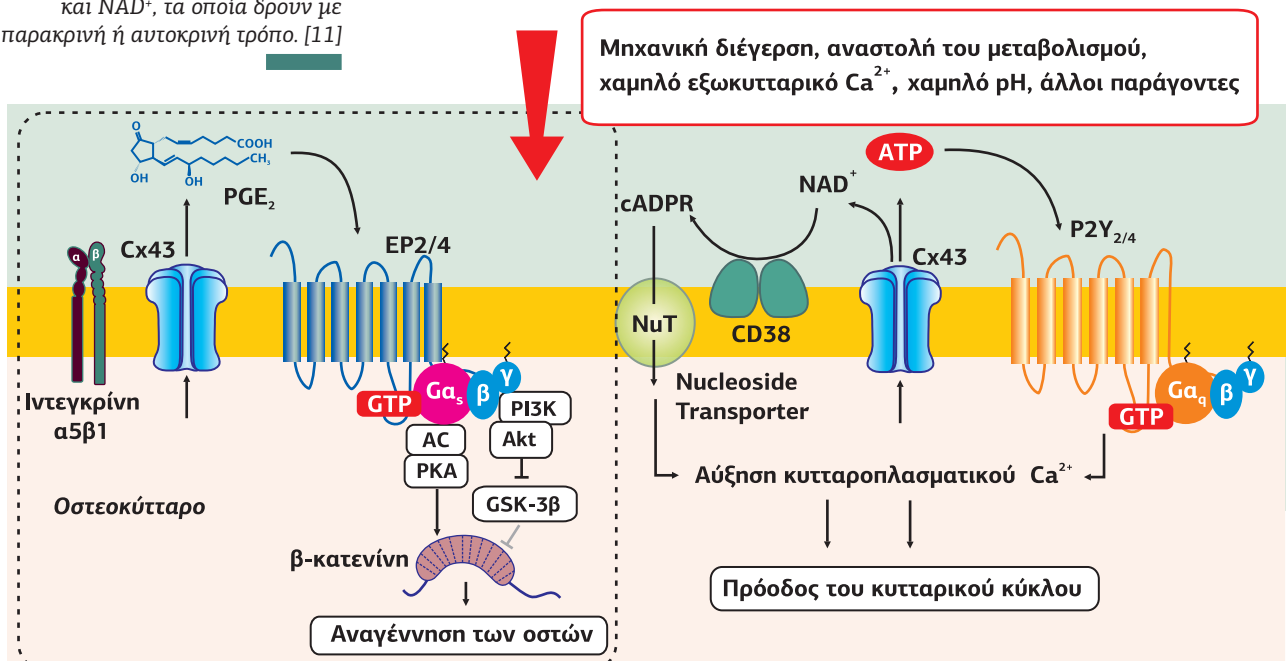
3.1

Ο ρόλος των ημιδιαύλων στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων

Ο ρόλος των ημιδιαύλων έχει δείχθει σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, με καλύτερα μελετημένο τον ρόλο του ATP που απελευθερώνεται από ημιδιαύλους στον εξωκυτταρικό χώρο και δρα παρακρινώς μέσω της σύνδεσης στους πουρινεργικούς του υποδοχείς.

Το εξωκυτταρικό ATP έχει ποικίλους ρόλους καθώς συμμετέχει:

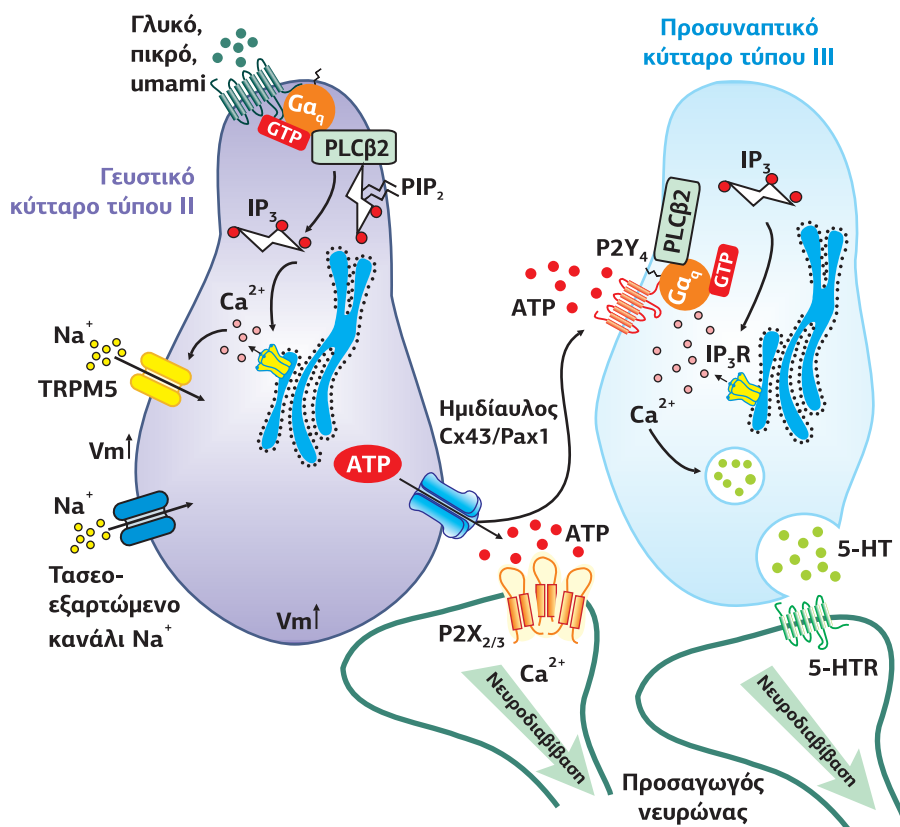
- στη ρύθμιση της ροής των αθροιστικών σωληναρίων των νεφρών,
- στην ενίσχυση της σύσπασης των σκελετικών μυών (κατά την επαναλαμβανόμενη διέγερση των σκελετικών μυών, τα εξωκυττάρια επίπεδα ATP αυξάνονται, ενεργοποιώντας πουρινεργικούς GPCR P2Y1 υποδοχείς, αυξάνοντας την εισροή Ca^{2+} και την ενίσχυση της συσταλτικής δύναμης των σκελετικών μυών),
- στην επούλωση των πληγών (η εκτενής επικοινωνία μεταξύ κυττάρων κατά



τη διάρκεια της αναγέννησης των ιστών συντονίζεται από πουρινεργική σηματοδότηση μέσω του εξωκυττάριου ATP),

- στη μετάδοση της αίσθησης της γεύσης (βλ. παρακάτω),
- στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (το εξωκυτταρικό ATP οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και πολλαπλασιασμό),
- στην προσκόλληση μονοκυττάρων - ενδοθηλιακών κυττάρων,
- στη χημειοταξία των ουδετερόφιλων και στη νευρωνική μετανάστευση μέσω της αύξησης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} που προκαλεί η ενεργοποίηση των πουρινεργικών υποδοχέων.

Χαρακτηριστικός είναι ο ρόλος του εξωκυτταρικού ATP που απελευθερώνεται από ημιδιαύλους στη μετάδοση των γεύσεων γλυκό, πικρό και umami από τους γευστικούς κάλυκες της γλώσσας στον εγκέφαλο. Οι γεύσεις αυτές συνδέονται στα γευστικά κύτταρα τύπου II σε υποδοχείς GPCRs, οι οποίοι μέσω της ενεργοποίησης μιας $\text{G}\alpha_q$ πρωτεΐνης ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C ($\text{PLC}\beta 2$), οδηγώντας στην αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} . Η αύξηση $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ανοίγει κανάλια παροδικού ρεύματος κατιόντων (Transient Receptor Potential cation channel, TRPM5), από τα οποία εισέρχεται Na^+ που εκπολώνει την κυτταρική μεμβράνη (Vm) και διεγείρει το άνοιγμα των τασηο-εξαρτώμενων καναλιών Na^+ και τη δημιουργία δυναμικού δράσης (action potential). Ως απάντηση της γευσεο-εξαρτώμενης εκπόλωσης οι ημιδιαύλοι Cx43/Panx1 ανοίγουν και εξέρχεται στον εξωκυτταρικό χώρο ATP. Το εξωκυτταρικό ATP δρα ως νευροδιαβιβαστής, δηλαδή συνδέεται σε πουρινοϋποδοχείς $\text{P2X}_2/\text{P2X}_3\text{R}$ των μετασυναπτικών νευρώνων ή εναλλακτικά σε πουρινοϋποδοχείς P2Y_4 των γειτονικών γευστικών κυττάρων τύπου III, οι οποίοι ενεργοποιώντας την αύξηση του κυτταροπλάσματικού Ca^{2+} προκαλούν την απελευθέρωση της σεροτονίνης (5-HT). Η 5-HT είναι ένας νευροδιαβιβαστής, ο οποίος συνδέεται και ενεργοποιεί τους μετασυναπτικούς προσαγωγούς νευρώνες, μεταφέροντας το γευστικό μήνυμα στον εγκέφαλο (Εικόνα 2.16).



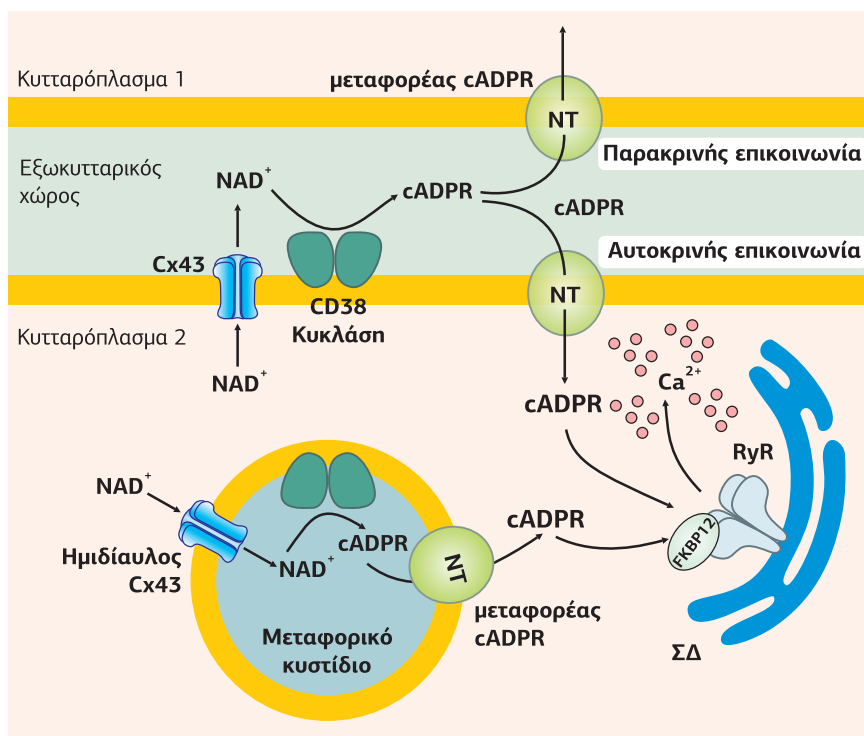
Εικόνα 2.16

Ρόλος των ημιδιαύλων Cx43/Panx1 στην παρακρινή σηματοδότηση για τη μετάδοση του γευστικού ερεθίσματος. Οι γεύσεις γλυκό, πικρό, umami, συνδέονται σε υποδοχείς GPCRs των γευστικών κυττάρων οδηγώντας μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C στην παραγωγή DAG και IP_3 και στην αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} . Η αύξηση $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ανοίγει κανάλια παροδικού ρεύματος κατιόντων (TRPM5), από τα οποία εισέρχεται Na^+ που εκπολώνει την κυτταρική μεμβράνη (Vm) και διεγείρει το άνοιγμα των τασηο-εξαρτώμενων καναλιών Na^+ και τη δημιουργία δυναμικού δράσης (action potential, AP). Ως απάντηση της γευσεο-εξαρτώμενης εκπόλωσης οι ημιδιαύλοι Cx43/Panx1 ανοίγουν απελευθερώνοντας ATP. Το εξωκυτταρικό ATP δρα ως νευροδιαβιβαστής, δηλαδή συνδέεται σε πουρινοϋποδοχείς $\text{P2X}_2/\text{P2X}_3\text{R}$ κανάλια των μετασυναπτικών νευρώνων ή εναλλακτικά σε GPCRs υποδοχείς P2Y_4 σε γειτονικά προσυναπτικά γευστικά κύτταρα τύπου III, οδηγώντας μέσω της αύξησης του $[\text{Ca}^{2+}]_i$ στην απελευθέρωση της σεροτονίνης (5-HT). Η 5-HT, στη συνέχεια, ενεργοποιεί τους νευρώνες μεταφέροντας το μήνυμα στον εγκέφαλο. [55]

Η προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2) αναγνωρίστηκε ως ένας από τους παρακρινείς διαμεσολαβητές που απελευθερώνεται από τα οστεοκύτταρα μέσω των ημιδιαύλων Cx43, έπειτα από μηχανική διέγερση και ρυθμίζει τη συνεχή διαδικασία της αναδιαμόρφωσης των οστών. Η ανάπτυξη των οστών διαμορφώνεται με μια καλά ισορροπημένη διεργασία οστικής επαναρρόφησης και σχηματισμού. Η κοννεξίνη Cx43 είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη στα οστεοκύτταρα και διευκολύνει την επικοινωνία τους με τα υπόλοιπα κύτταρα των οστών (οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και επενδυματικά) είτε μέσω χασμοσυνδέσμων είτε μέσω ημιδιαύλων. Στα οστεοκύτταρα τα μηχανικά σήματα, μέσω της ιντεγκρίνης $\alpha 5 \beta 1$ (μιας πρωτεΐνης εστιακής προσκόλλησης που συνδέεται με τους ημιδιαύλους Cx43), οδηγούν στο άνοιγμα των ημιδιαύλων Cx43. Από τους ανοικτούς ημιδιαύλους απελευθερώνεται PGE_2 , η οποία ενεργοποιεί τους GPCRs EP2/4 των οστεοβλαστών και διεγείρει την ανάπτυξη των οστών μέσω των μονοπατιών AC/ cAMP/ PKA και PI3K/ Akt/ Wnt/ β -κατενίνη (βλ. **Εικόνα 2.15**). Η PGE_2 σε υψηλές συγκεντρώσεις επάγει την οστική επαναρρόφηση ενισχύοντας τον σχηματισμό και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών.

Το NAD^+ εξέρχεται μέσω ημιδιαύλων Cx43 στον εξωκυτταρικό χώρο, ενώ η φυσιολογική διέγερση είναι ακόμη άγνωστη. Το NAD^+ κυκλοποιείται εξωκυτταρικά από ένα διαμεμβρανικό ένζυμο, το εκτοένζυμο CD38, που φέρει το καταλυτικό κέντρο στην εξωκυτταρική του περιοχή, και μετατρέπεται σε κυκλική ADP-ριβόζη (cADPR). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο εισέρχεται στα κύτταρα η cADPR δεν είναι γνωστός. Έχουν προταθεί το ίδιο το εκτοένζυμο CD38, οι ημιδιαύλοι Cx43 και ο μεταφορέας νουκλεοσιδίων NT. Αφού βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, η cADPR συνδέεται μέσω της πρωτεΐνης FKBP12 στους υποδοχείς ρυανοδίνης του ΕΔ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 2.17**). Η cADPR-εξαρτώμενη αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) ελέγχει πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως η γονιμοποίηση του ωαρίου, η αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του κυττάρου, μικραίνοντας τη διάρκεια της φάσης S, η σύσπαση του μυός, η έκκριση των ορμονών και η ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, όταν το κυτταροπλασματικό Ca^{2+} αυξάνεται, τότε η cADPR λειτουργεί ως ένας μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης: ενεργοποιείται η PKC που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τις κοννεξίνες και μειώνει τη διαπερατότητα στο NAD^+ και έτσι ελαττώνεται η παραγωγή cADPR.

Εικόνα 2.17
Ημιδιαύλοι κοννεξίνης 43 (Cx43) μεσολαβούν στη σηματοδότηση της κυκλικής ADP-ριβόζης (cADPR), επιτρέποντας την έξοδο από το κύτταρο του πρόδρομου μορίου της cADPR, του NAD^+ . Το NAD^+ στον εξωκυτταρικό χώρο κυκλοποιείται από το εκτοένζυμο CD38 και μετατρέπεται σε cADPR. Αυτή εισέρχεται μέσω του μεταφορέα NT (Nucleoside Transporter) στο κύτταρο, συνδέεται με τους υποδοχείς ρυανοδίνης του ΕΔ και επάγει την απελευθέρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. [6]



Επιπλέον, έχει προταθεί ότι σε δυσλειτουργικούς ημιδιαύλους θα μπορούσαν να οφείλονται ομοιοστατικές ανισορροπίες που παρατηρούνται σε πολλές ασθένειες, καθώς το απορρυθμισμένο άνοιγμα των ημιδιαύλων θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη μέσω διαφόρων μηχανισμών: α. αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ που προκαλείται από είσοδο εξωκυτταρικού Ca^{2+} , β. κυτταρική διόγκωση που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη εισροή Na^+ και Cl^- και γ. την εξάπλωση των τοξικών μορίων που απελευθερώνονται από ημιδιαύλους (π.χ. γλουταμινικό) τραυματισμένων κυττάρων.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το άνοιγμα των ημιδιαύλων αποτελεί μέρος των κυτταρικών δραστηριοτήτων. Όταν οι ημιδιαύλοι μεταφέρουν φυσιολογικής σημασίας σήματα, η αξία τους είναι προφανής. Αντιθέτως, όταν οι ημιδιαύλοι ανοίγουν κάτω από συνθήκες αναστολής του μεταβολισμού ή χαμηλών εξωκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} , υπάρχει μικρή λογική στο να σκεφτούμε ότι η αντίδραση είναι χρήσιμη, αν και ο περιορισμένος κυτταρικός θάνατος δεν είναι πάντα κακός για τον οργανισμό. Επιπλέον, οι ημιδιαύλοι που σχηματίζονται από διαφορετικές κοννεξίνες μπορούν να ρυθμίζουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες μέσω της εξειδικευμένης απελευθέρωσης σηματοδοτικών μορίων.

4. Μεταλλάξεις των κοννεξινών που δημιουργούν σοβαρές δυσλειτουργίες

Ο σημαντικός φυσιολογικός ρόλος των κοννεξινών αντικατοπτρίζεται από την ποικιλία ασθενειών που συνδέονται με μεταλλάξεις στα γονίδια Cx (βλ. **Πίνακας 2.1**). Μεταλλάξεις διαφορετικών Cxs μπορούν να προκαλέσουν την ίδια ασθένεια, υποδεικνύοντας ότι ορισμένοι τύποι Cxs έχουν παρόμοια λειτουργία σε ένα συγκεκριμένο τύπο ιστού. Για παράδειγμα, η Cx26 και η Cx30 εκφράζονται στον κοχλία, και μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια μπορεί να προκαλέσουν κώφωση. Επίσης, διαφορετικές μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο Cx μπορεί να οδηγήσουν σε τελείως διαφορετικές ασθένειες: για παράδειγμα η μετάλλαξη 66delD στην Cx31 προκαλεί κληρονομική αισθητηριακή νευροπάθεια και κώφωση, ενώ άλλες μεταλλάξεις της Cx31 προκαλούν ερυθροκερατόδερμα με ή χωρίς κώφωση.

Πίνακας 2.1

Ανθρώπινες ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις διαφόρων κοννεξινών

Μεταλλαγμένη κοννεξίνη	Ανθρώπινες διαταραχές
Cx32	Νευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth
Cx26, Cx30, Cx31	Κώφωση
Cx26, Cx30.3, Cx31	Επιδερμική ασθένεια, ερυθροκερατόδερμα (EKV)
Cx40, Cx43	Καρδιαγγειακές ασθένειες
Cx43, Cx46, Cx50	Σχηματισμός καταρράκτη

4.1

Η Νευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth προκαλείται από μετάλλαξη της Cx32

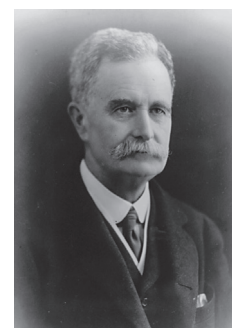
Η πρώτη ασθένεια, η οποία συνδέθηκε με τις κοννεξίνες, ήταν η νευροπάθεια Charcot-Marie-Tooth (CMT). Η ασθένεια αυτή πήρε το όνομά της από αυτούς που την περιέγραψαν για πρώτη φορά το 1886: ο Martin Charcot (1825–1893), ο Pierre Marie (1853–1940) και ο Howard Henry Tooth (1856–1925). Χαρακτηρίζεται από προοδευτική ατροφία του μυϊκού ιστού και απώλεια της αίσθησης αφής σε διάφορα σημεία του σώματος. Πρόκειται για μία από τις πιο κοινές κληρονομικές ασθένειες που προσβάλλει 1 στα 2.500 άτομα και έως σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία.



Martin Charcot
(1825–1893)

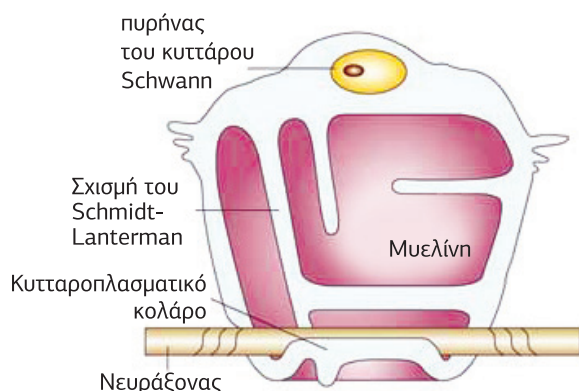


Pierre Marie
(1853–1940)

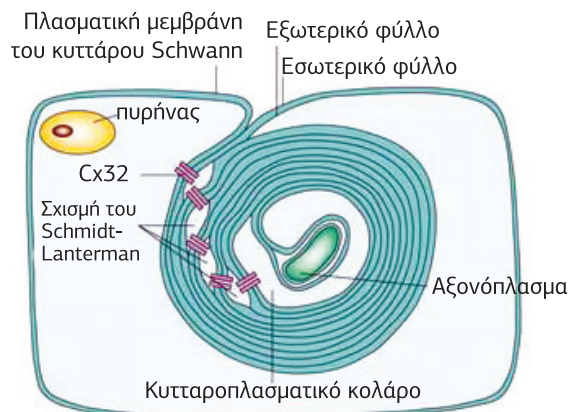


Howard Henry Tooth
(1856–1925)

A



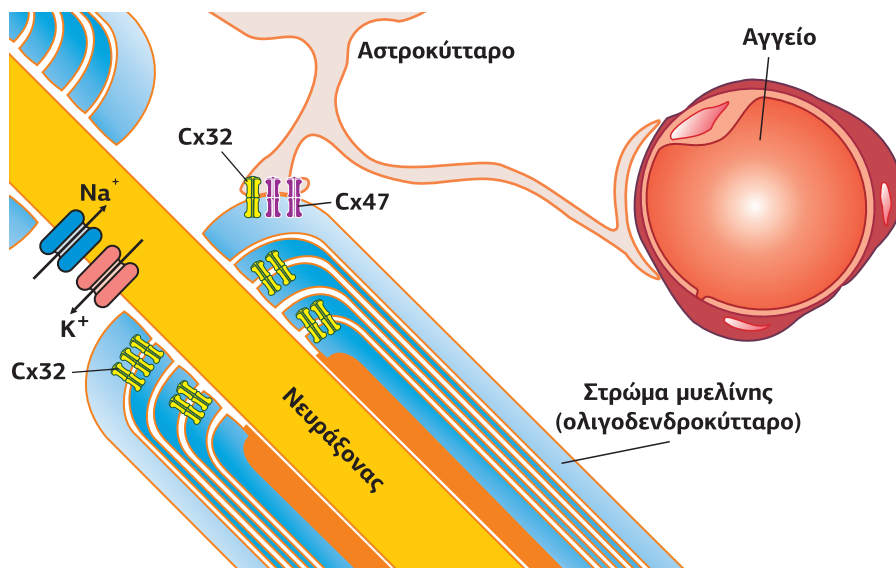
B

**Εικόνα 2.18**

A και B. Σχηματική αναπαράσταση ενός κυττάρου Schwann που περιέλλοι γύρω από τον άξονα νευρικού κυττάρου, στο Περιφερικό ΝΣ. Διακρίνονται, ο πυρήνας του, η μυελίνη και οι χασμοσύνδεσμοι Cx32 ανάμεσα στις αναδιπλώσεις της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου Schwann. [25]

Γ. Στο ΚΝΣ, οι εμύελοι νευράξονες περιβάλλονται από τα ολιγοδενδροκύτταρα. Με χασμοσυνδέσμους Cx32 συνδέονται οι αναδιπλώσεις της πλασματικής μεμβράνης των ολιγοδενδροκυττάρων, ενώ τα ολιγοδενδροκύτταρα επικοινωνούν με τα γειτονικά τους αστροκύτταρα με χασμοσυνδέσμους Cx47 και Cx32.

Γ



Η ασθένεια Charcot-Marie-Tooth (CMT) οφείλεται σε μεταλλάξεις της Cx32. Η Cx32 βρίσκεται στα κύτταρα του Schwann, τα κύτταρα μυελίνης που περιέλλοι γύρω από τους άξονες των νευρώνων του ΠΝΣ, όπου δημιουργεί χασμοσυνδέσμους ανάμεσα στις αναδιπλώσεις της πλασματικής μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο οι χασμοσύνδεσμοι εξυπηρετούν τη γρήγορη μεταφορά μεταβολιτών και άλλων μικρών μορίων διαμέσου των στρωμάτων της μυελίνης και κατά συνέπεια ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό και τη μεταφορά σημάτων Ca^{2+} (Εικόνα 2.18). Η Cx32 επίσης συμμετέχει στην εξωκυτταρική σηματοδότηση μέσω απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών από ημιδιαύλους.

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί 200 διαφορετικές μεταλλάξεις της Cx32, οι περισσότερες από τις οποίες είτε οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας λόγω αδυναμίας σχηματισμού χασμοσυνδεσμικών πλακών είτε μεταβάλλουν την αγωγιμότητα χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση των χασμοσυνδέσμων. Και στις δύο περιπτώσεις οδηγούν σε καταστροφή του στρώματος μυελίνης και εκφυλισμό των αξόνων περιφερικών νευρώνων, χαρακτηριστικό της νευροπάθειας CMT-X. Οι μεταλλάξεις της Cx32 μπορεί, επίσης, να επηρεάσουν και τη διαπερατότητα των ημιδιαύλων: για παράδειγμα η μετάλλαξη S805C στη 2η διαμεμβρανική περιοχή της Cx32 αυξάνει τη διαπερατότητα των ημιδιαύλων Cx32, οδηγώντας σε απώλεια ιόντων και μικρών μεταβολιτών καθώς και σε είσοδο ιόντων Ca^{2+} , που προκαλεί τον γρήγορο θάνατο των κυττάρων Schwann, και συνεπώς στην απο-μυελίνωση των περιφερικών νευρώνων.

4.2

Το ερυθροκερατόδερμα προκαλείται από μεταλλάξεις των Cx26, Cx31 και Cx30.3

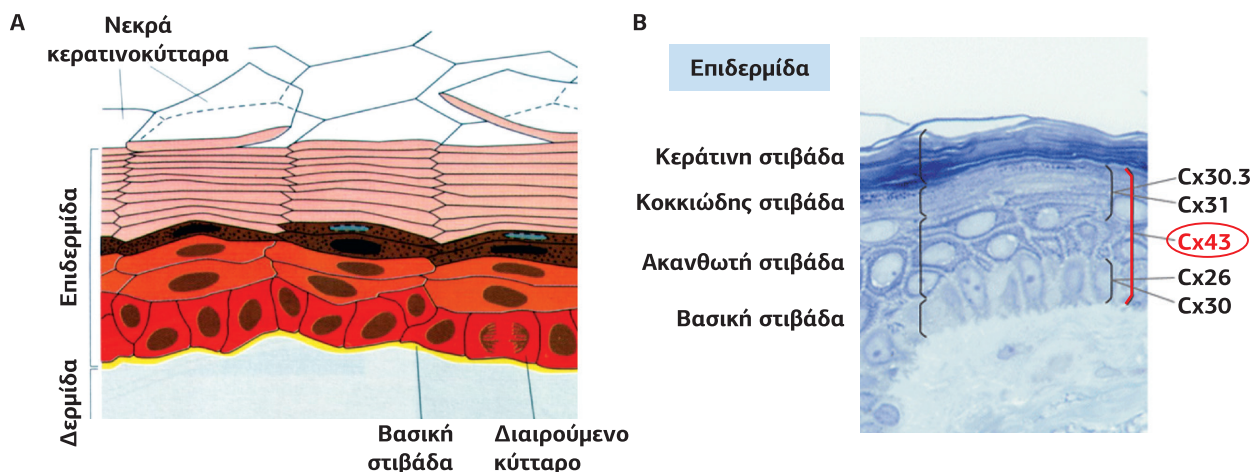
Στο ανθρώπινο δέρμα, η διακυτταρική επικοινωνία μεσολαβείται κυρίως από την Cx43, που ανήκει στην οικογένεια α και εκφράζεται σε όλη την επιδερμίδα, και από κοννεξίνες της οικογένειας β (Cx26, Cx30, Cx31), οι οποίες εντοπίζονται πιο στοχευμένα. Για παράδειγμα, οι Cx26 και Cx30 βρίσκονται στη βασική στιβάδα που εμφανίζει έντονο πολλαπλασιασμό (Εικόνα 2.19).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ο αριθμός των χασμοσυνδέσμων αυξάνεται στην επιδερμίδα, υποδηλώνοντας τον σημαντικό ρόλο που παίζουν οι χασμοσύνδεσμοι στην ανάπτυξη του εμβρυακού δέρματος. Συγκεκριμένα, η τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων απαιτεί τη συντονισμένη έκφραση πολλών γονιδίων κοννεξινών. Μεταλλάξεις σε γονίδια Cxs συνδέονται με πολλές δερματικές ασθένειες, επισημαίνοντας τον κρίσιμο ρόλο των Cxs στη διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της επιδερμίδας.

Η Cx31 ήταν το πρώτο γονίδιο κοννεξίνης που αναγνωρίστηκε να προκαλεί μια ασθένεια της επιδερμίδας γνωστή ως erythrokeratoderma variabilis (EKV), που χαρακτηρίζεται από κόκκινα σημάδια σε πολλές πλευρές της επιδερμίδας και υπερκεράτωση. Οι μεταλλάξεις της Cx31 φαίνεται να επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων παρά τον πολλαπλασιασμό τους. Την ίδια ασθένεια βρέθηκαν να προκαλούν και μεταλλάξεις των γονιδίων Cx30.3 και Cx26.

Εικόνα 2.19

Α. Σχηματική αναπαράσταση των στιβάδων της επιδερμίδας. Β. Στην ανθρώπινη επιδερμίδα, η διακυτταρική επικοινωνία μεσολαβείται κυρίως μέσω της Cx43, η οποία εκφράζεται σε όλη την επιδερμίδα, και από τις κοννεξίνες Cx26, Cx30, Cx31, Cx30.3, οι οποίες εντοπίζονται πιο στοχευμένα. Για παράδειγμα, οι Cx26 και Cx30 βρίσκονται στη βασική στιβάδα που εμφανίζει έντονο πολλαπλασιασμό. [44]

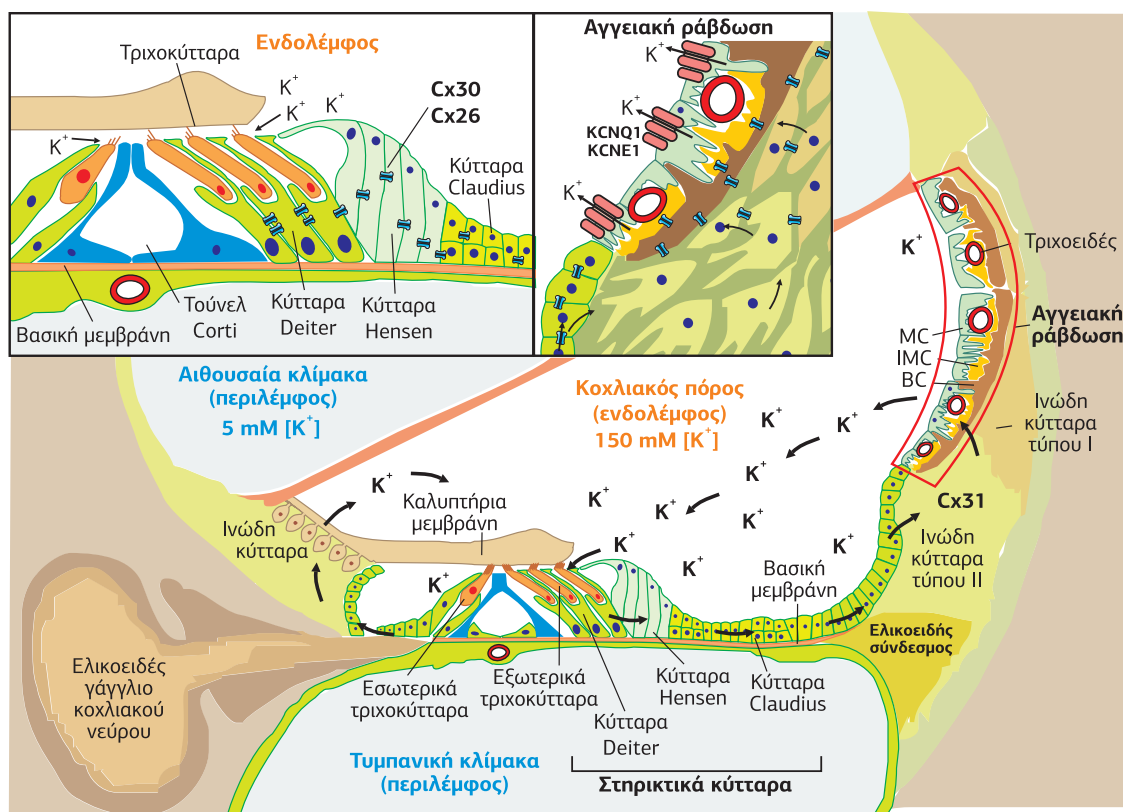


4.3

Κληρονομική κώφωση από μεταλλάξεις των Cx26, Cx30, Cx31

Ο κοχλίας των θηλαστικών αποτελείται από τρία διαμερίσματα: τη **scala media** (κοχλιακός πόρος) που περιέχει την ενδολέμφο, ένα εξωκυτταρικό υγρό με υψηλή συγκέντρωση ιόντων K^+ (150 mM) σε αντίθεση με τα υπόλοιπα εξωκυτταρικά υγρά, τη **scala tympani** (τυμπανική κλίμακα) και τη **scala vestibule** (αιθουσαία κλίμακα), οι οποίες περιέχουν την περιλέμφο με χαμηλή συγκέντρωση ιόντων K^+ (3-5 mM).

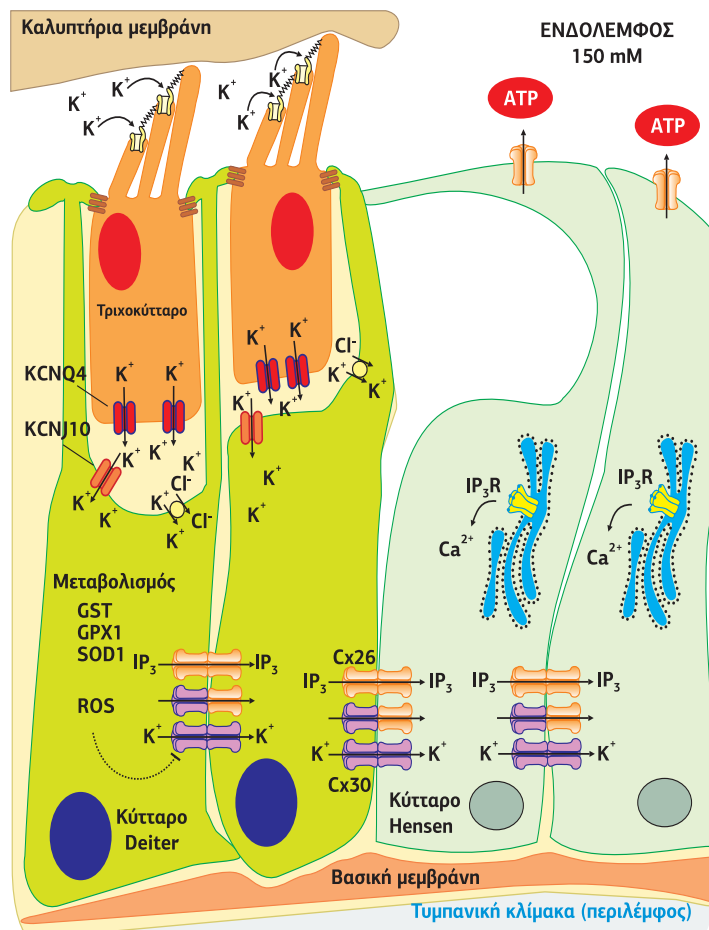
Οι βλεφαρίδες των τριχοκυττάρων βυθίζονται μέσα στην ενδολέμφο και, όταν ενεργοποιούνται από τα ηχητικά κύματα, μετατοπίζονται και ανοίγουν μηχανοεξαρτώμενα κανάλια K^+ . Λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης K^+ στην ενδολέμφο, τα ιόντα K^+ εισέρχονται στα τριχοκύτταρα οδηγώντας τα σε εκπόλωση, η οποία με τη σειρά της προκαλεί άνοιγμα των τασεοεξαρτωμένων καναλιών K^+ (κανάλια

**Εικόνα 2.20**

Ανακύκλωση των ιόντων K^+ στον κοχλία. Αρχικά, τα ιόντα K^+ εισέρχονται από τον κοχλιακό πόρο (που περιέχει ενδολήμφο με υψηλή συγκέντρωση ιόντων K^+) στα τριχοκύτταρα. Στη συνέχεια, μεταφέρονται μέσω χασμοσυνδέσμων στα στηρικτικά κύτταρα του οργάνου του Corti (κύτταρα Deiter, Hensen και Claudius), στα ινώδη κύτταρα του ελικοειδούς συνδέσμου και καταλήγουν στα κύτταρα της αγγειακής ράβδωσης (βασικά κύτταρα BC, ενδιάμεσα IMC και περιφερειακά MC). Από τα περιφερειακά κύτταρα τα K^+ εξέρχονται μέσω καναλιών KCNQ1/KCNE1 στην ενδολήμφο. [17]

Εικόνα 2.21

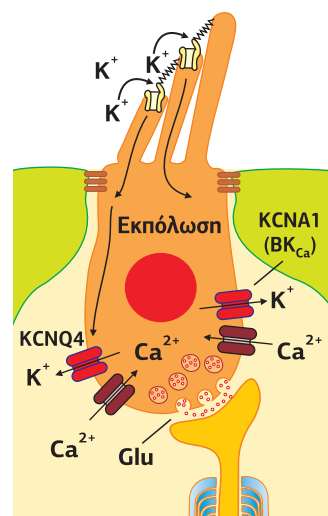
Είσοδος των ιόντων K^+ στα τριχοκύτταρα και μεταφορά τους στα στηρικτικά κύτταρα του οργάνου Corti. Όταν οι βλεφαρίδες των τριχοκυττάρων μετακινούνται λόγω της μεταφοράς των ηχητικών κυμάτων πάνω στη βασική μεμβράνη, ανοίγουν μηχανο-εξαρτώμενα κανάλια K^+ και εισέρχεται K^+ στα τριχοκύτταρα. Λόγω της εκπόλωσης των τριχοκυττάρων ανοίγουν τασεο-εξαρτώμενα κανάλια K^+ στη βάση των τριχοκυττάρων (KCNQ4) απελευθερώνοντας εξωκυτταρικά K^+ , το οποίο άμεσα μεταφέρεται μέσω συμμεταφορέων Cl^-/K^+ και καναλιών K^+ KCNJ10 στα κύτταρα Deiter (DCs). Στη συνέχεια, το K^+ μεταφέρεται στα κύτταρα Hensen μέσω χασμοσυνδέσμων Cx26/Cx30. Ο υψηλός ρυθμός μεταβολισμού στα κύτταρα του κοχλία οδηγεί στη δημιουργία ROS, οι οποίες βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο αντιοξειδωτικών ενζύμων (GTS, GPX1, SOD1). Οι ROS είναι αρνητικοί ρυθμιστές της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας, προκαλώντας ελάττωση της επικοινωνίας ανάμεσα στα κύτταρα. [42]



KCNQ4) και Ca^{2+} που βρίσκονται στη βάση των τριχοκυττάρων. Σε αυτήν την περίπτωση το K^+ βγαίνει από τα τριχοκυττάρια, γιατί η περιλήψος που περιβάλλει τη βάση των κυττάρων είναι φτωχότερη σε K^+ από ό,τι το κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, τα ιόντα K^+ που ελευθερώνονται στον εξωτερικό χώρο επιστρέφουν στην ενδολήμφο διαμέσου των κυττάρων του επιθηλιακού και του συνδετικού ιστού. Πιο συγκεκριμένα, το εξωκυτταρικό K^+ μεταφέρεται μέσω μεταφορών Cl^-/K^+ και καναλιών K^+ KCNJ10 (ένα μέλος των καναλιών inward rectifier-type potassium channel Kir4.1) στα κύτταρα Deiter. Τα κύτταρα Deiter, μαζί με τα κύτταρα Hensen και τα κύτταρα Claudius, αποτελούν τα στηρικτικά κύτταρα (supporting cells) του οργάνου του Corti και επικοινωνούν μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους Cx30 και Cx26, μέσω των οποίων μεταφέρονται τα ιόντα K^+ . Από τα στηρικτικά κύτταρα το K^+ και πάλι μέσω χασμοσυνδέσμων μεταφέρεται στα ινώδη κύτταρα (fibrocytes) του ελικοειδούς συνδέσμου (spiral ligament). Από εκεί μέσω Cx31 οδηγείται στην αγγειακή ράβδωση (stria vascularis), η οποία συνίσταται από βασικά (BC, Basal Cells), ενδιάμεσα (IMC, Intermediate Cells) και περιφερειακά κύτταρα (MC, Marginal Cells). Από τα περιφερειακά κύτταρα το K^+ επιστρέφει στην ενδολήμφο του κοχλιακού πόρου μέσω των καναλιών KCNQ1/KCNE1 (Εικόνα 2.20, 2.21, βλ. 4.93B).

Έχουν βρεθεί περισσότερες από 60 μεταλλάξεις στα γονίδια της Cx26, Cx30 και Cx31, οι οποίες προκαλούν απώλεια ακοής. Ορισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις οδηγούν στον πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης, ενώ οι μεταλλάξεις loss-of-function έχουν ως αποτέλεσμα τον λανθασμένο εντοπισμό των χασμοσυνδέσμων και τη μη δημιουργία χασμοσυνδεσμικών πλάκων στη μεμβράνη ή την αποτυχία ανοίγματος των χασμοσυνδέσμων. Η κληρονομική κώφωση είναι αρκετά συχνή, καθώς εμφανίζεται σε ποσοστό 1/1.000 γεννήσεις.

Εκτός από την κληρονομική κώφωση και η λόγω ηλικίας απώλεια ακοής πιθανόν να οφείλεται στην ελάττωση της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS και της ελαττωμένης λειτουργίας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (GTS, GPX1, SOD1) στον κοχλία. Ο υψηλός ρυθμός μεταβολισμού στα κύτταρα του κοχλία οδηγεί στη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι αρνητικοί ρυθμιστές της χασμοσυνδεσμικής επικοινωνίας ανάμεσα στα κύτταρα του κοχλία διαταράσσοντας την ανακύκλωση του K^+ (Εικόνα 2.21).



Η είσοδος του K^+ εκπολώνει τα τριχοκύτταρα οδηγώντας στο άνοιγμα τάση-εξαρτώμενων καναλιών Ca^{2+} και στην απελευθέρωση του γλουταμινικού που ενεργοποιεί τους ακουστικούς νευρώνες. Η αύξηση του Ca^{2+} στη συνέχεια ανοίγει τα Ca^{2+} -εναίσθητα κανάλια KCNA1 (BK_{Ca}) οδηγώντας στην έξοδο K^+ και στην υπερπόλωση του τριχοκυττάρου.

4.4 | Ο καταρράκτης ως αποτέλεσμα έλλειψης Cx43, Cx46 και Cx50

Τι είναι ο καταρράκτης;

Ο οφθαλμός μας περιέχει έναν μικρό φακό σχήματος φακής, μεγέθους 10 mm. Ο φακός αυτός βρίσκεται πίσω από τον κερατοειδή χιτώνα και την ίριδα και χρησιμεύει στην εστίαση των ακτίνων του φωτός πάνω στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Ο φακός, ο οποίος φυσιολογικά είναι διαυγής, μπορεί να θολώσει και να χάσει τη διαφάνειά του από διάφορα αίτια, από τα οποία το συχνότερο είναι το γήρας. Η θόλωση αυτή ονομάζεται καταρράκτης (Εικόνα 2.22). Ο **γεροντικός καταρράκτης**, που είναι η συχνότερη μορφή καταρράκτη, παρουσιάζεται συνήθως μετά την ηλικία των 65 ετών. Υπάρχει όμως και ο **κληρονομικός καταρράκτης** (1/10.000), που εμφανίζεται κατά τη γέννηση ή κατά την παιδική ηλικία και οφείλεται σε μεταλλάξεις των κοννεξινών Cx43, Cx46 και Cx50.

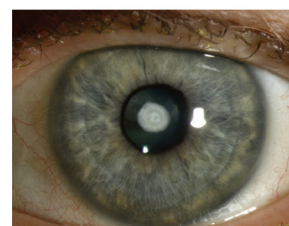
Το συχνότερο σύμπτωμα είναι η προοδευτική μείωση της όρασης, η οποία δεν μπορεί να διορθωθεί με γυαλιά. Άλλα συμπτώματα είναι το έντονο θάμβος στο φως και η εμφάνιση ή η αύξηση της υπάρχουσας μυωπίας σε μεγάλη ηλικία.

Ο ρόλος των χασμοσυνδέσμων στη φυσιολογία του φακού

Ο φακός αποτελείται από επιθηλιακά και ινώδη κύτταρα (fiber cells). Τα ινώδη κύτταρα είναι υψηλά διαφοροποιημένα, καθώς χάνουν νωρίς τα εσωτερικά τους μεμβρανώδη οργανίδια, συσσωρεύοντας υψηλές συγκεντρώσεις μιας διαλυτής πρωτεΐνης,



Φυσιολογικός φακός



Φακός με κληρονομικό καταρράκτη

Εικόνα 2.22

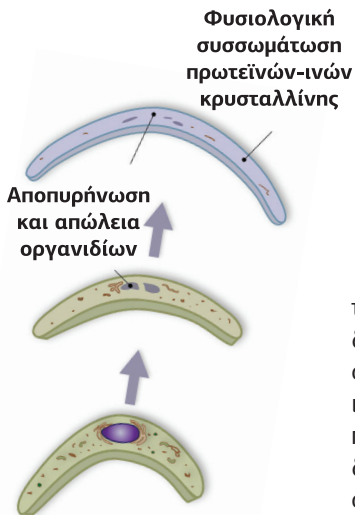
Ο καταρράκτης στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από ζώνες θαμπάδας στον φακό. Η φωτογραφία της πρώτης σειράς απεικονίζει έναν κανονικό φακό χωρίς καταρράκτη, ενώ της δεύτερης έναν πυρηνικό καταρράκτη. [19]

Εικόνα 2.23

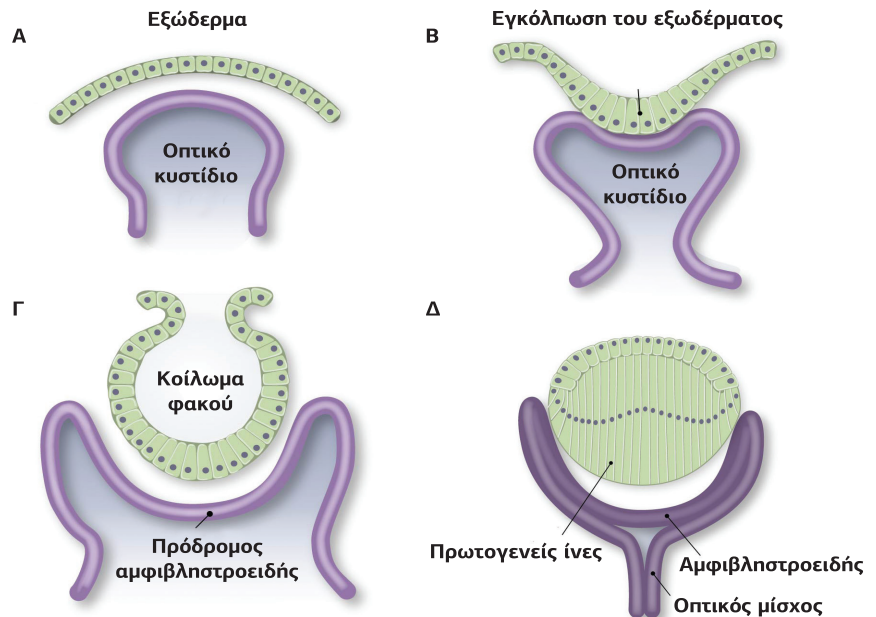
Φυσιολογική ανάπτυξη του φακού των θηλαστικών. Α. Ο σχηματισμός του φακού ξεκινά με την επιμήκυνση του εξωδέρματος πάνω από το οπτικό κυστίδιο. Β.-Γ. Στη συνέχεια, το εξωδερμα σχηματίζει μία εγκόλπωση που τελικά κλείνει. Δ. Τέλος, τα κύτταρα του εξωδέρματος διαφοροποιούνται και σχηματίζουν τις πρωτογενείς ίνες στον ισημερινό του φακού. Στην εικόνα Ε διακρίνονται τα ινώδη κύτταρα του φακού. Τα μόνα κύτταρα που διατηρούν ικανότητα πολλαπλασιασμού είναι εκείνα που βρίσκονται στην επιφάνεια του φακού. Καθώς δημιουργούνται νέα κύτταρα, τα παλαιότερα βυθίζονται βαθύτερα μέσα στον φακό χάνοντας προοδευτικά όλα τα οργανίδιά τους. Σε αυτήν τη θέση θα παραμείνουν έως το τέλος της ζωής του οργανισμού. Ζ. Διακρίνεται ένα ινώδες κύτταρο του φακού και η διαδικασία διαφοροποίησής του. Χάνει τον πυρήνα και τα οργανίδιά του, και συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες κρυσταλλίνης. [56]

Ζ

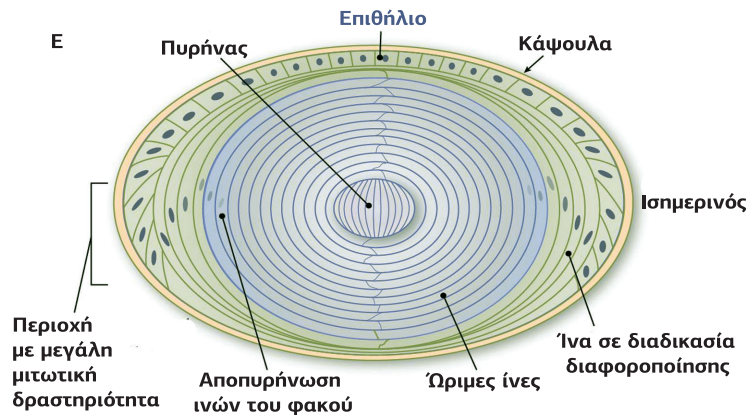
Ίνα σε διαδικασία διαφοροποίησης



Αναπτυξιακά στάδια του φακού

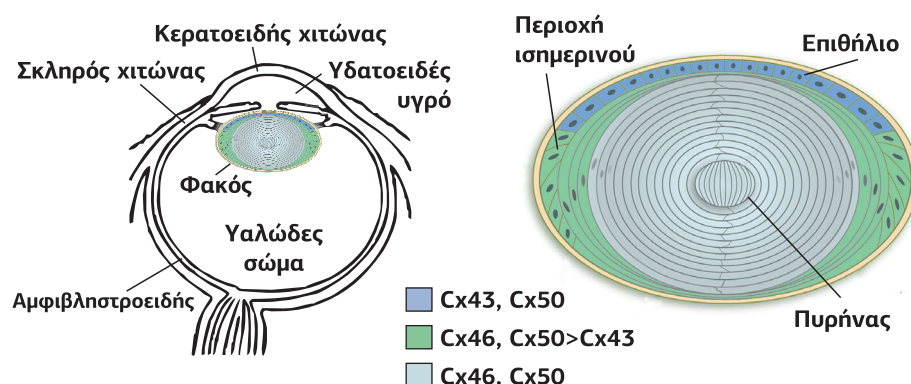


Εγκάρσια τομή ώριμου φακού των θηλαστικών



της **κρυσταλλίνης**, η οποία προσδίδει την απαραίτητη ελαστικότητα και τον υψηλό δείκτη διάθλασης για την προσαρμογή του φακού και τα κάνει να φαίνονται διαφανή. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους τα ινώδη κύτταρα χάνουν την ικανότητα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, του ενεργού μεταβολισμού και της αναπαραγωγής, αφού χάνουν και τα ιδιαίτερα οργανίδιά τους. Τα μόνα κύτταρα που διατηρούν ικανότητα διπλασιασμού είναι εκείνα που βρίσκονται στην επιφάνεια του φακού. Καθώς δημιουργούνται νέα κύτταρα, τα παλαιότερα βυθίζονται βαθύτερα μέσα στον φακό, όπου ωριμάζουν (**Εικόνα 2.23**).

Το 1991 ανακαλύφθηκε ότι τα ινώδη κύτταρα του φακού συνδέονται μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους, δημιουργώντας ένα λειτουργικό συγκύτιο. Ταυτόχρονα συνδέονται μέσω χασμοσυνδέσμων και με τα επιθηλιακά κύτταρα, και με αυτόν τον τρόπο εξαρτώνται από το μεταβολικά ενεργό επιθήλιο για να διατηρήσουν την απαραίτητη ιοντική συγκέντρωση για την αποφυγή κατακρήμνισης της κρυσταλλίνης, καθώς ο φακός δεν περιέχει αγγεία. Οι χασμοσυνδέσμοι στον φακό αποτελούνται από μια ποικιλία κοννεξινών, η οποία συνεισφέρει στην ομοιοστάση του φακού. Στον φακό των σπονδυλωτών εκφράζονται οι Cx43, Cx46 και Cx50. Κατά τη διαφοροποίηση σε ινώδη κύτταρα κρυσταλλίνης, η έκφραση της Cx43 μειώνεται, ενώ αυξάνεται η Cx46 και η Cx50. Έχει διαπιστωθεί πως τα επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν την Cx43 μπορούν να δημιουργήσουν ετεροτυπικούς χασμοσυνδέσμους

**Εικόνα 2.24**

Οι χασμοσύνδεσμοι στον φακό αποτελούνται από μια ποικιλία κοννεξινών. Στον φακό των σπονδυλωτών εκφράζονται οι **Cx43**, **Cx46** και **Cx50**. Κατά τη διαφοροποίηση των ινωδών κυττάρων η έκφραση της Cx43 μειώνεται, ενώ αυξάνεται η Cx46 και η Cx50, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ένωση των ινών του φακού σε ένα λειτουργικό συγκύτιο. [8]

με κύτταρα που εκφράζουν την Cx46, αλλά όχι με κύτταρα που εκφράζουν την Cx50, γεγονός που σημαίνει πως η επικοινωνία δεν είναι ισοδύναμη κατά τα αναπτυξιακά στάδια του φακού. Οι Cx46 και Cx50 είναι υπεύθυνες για την ένωση των ινών του φακού σε ένα λειτουργικό συγκύτιο (**Εικόνα 2.24**).

Ποντίκια από τα οποία απουσιάζουν οι Cx46 και Cx50 εμφανίζουν καταρράκτη, ενώ η απουσία Cx43 δεν έχει μεγάλη επίδραση. Επιπλέον, loss-of-function μεταλλάξεις της Cx46 και Cx50 αναγνωρίστηκαν σε οικογένειες με κληρονομικό καταρράκτη.

4.5

Ανώμαλη καρδιακή αγωγή των δυναμικών απουσία Cx40, Cx45 και Cx43

Η καρδιά είναι μια διπλή αντλία, αφού πρώτα συστέλλονται οι κόλποι και αμέσως μετά συστέλλονται οι κοιλίες. Η συστολή του καρδιακού μυός πυροδοτείται από εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης των μυοκυττάρων. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα είναι ενωμένα μεταξύ τους με **εμβόλιμους δίσκους**, οι οποίοι αποτελούνται από χασμοσυνδέσμους (**Εικόνα 2.25**). Αυτοί επιτρέπουν την ταχύτατη διάδοση των δυναμικών δράσης (καρδιακών παλμών) από το ένα κύτταρο στο άλλο. Έτσι, η αρχική διέγερση ενός μυοκαρδιακού κυττάρου καταλήγει σε διέγερση όλων των κυττάρων.

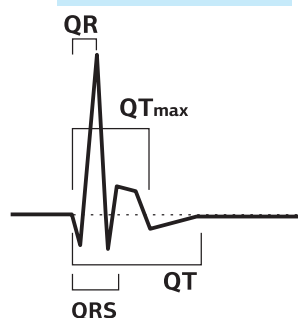
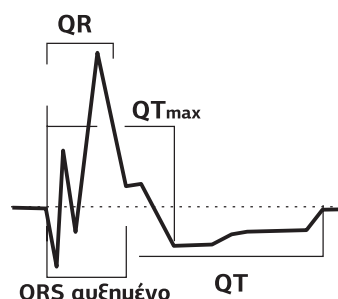
Η εκπόλωση αρχικά εκδηλώνεται στον φλεβόκομβο. Στη συνέχεια, τα δυναμικά δράσης διαδίδονται από τον φλεβόκομβο σε όλη την καρδιά, περνώντας από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των χασμοσυνδέσμων, κατά τέτοιον τρόπο ώστε να προκαλεί πρώτα συστολή των κόλπων και μετά των κοιλιών. Η διάδοση των δυναμικών από τον δεξιό κόλπο στον αριστερό είναι αρκετά γρήγορη, ώστε οι δύο κόλποι να εκπολώνονται και να συστέλλονται ουσιαστικά ταυτόχρονα. Η διάδοση του δυναμικού δράσης στις κοιλίες είναι πιο περίπλοκη. Ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στην εκπόλωση των κόλπων και των κοιλιών είναι ο κολποκοιλιακός κόμβος, ο οποίος εκπο-

**Εικόνα 2.25**

Τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους, οι οποίοι βρίσκονται στους εμβόλιμους δίσκους.

Εικόνα 2.26

Ο φλεβόκομβος είναι ο βηματοδότης της καρδιάς, ο οποίος δημιουργεί τα δυναμικά δράσης. Τα δυναμικά δράσης διαδίδονται σχεδόν ταυτόχρονα στους δύο κόλπους, φτάνουν στον κολποκοιλιακό κόμβο και στη συνέχεια το δερμάτιο του His και οι ίνες Purkinje κατανέμονται άμεσα τα δυναμικά δράσης στις δύο κοιλίες.

**ΗΚΓ Άγριου τύπου****ΗΚΓ Cx40 Knockout****Εικόνα 2.27**

Το δυναμικό δράσης διαδίδεται από τον φλεβόκομβο σε όλη την καρδιά, περνώντας από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των χασμοσυνδέσμων Cx40. Διακρίνουμε ένα ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) σε ποντίκια άγριου τύπου και σε knockout Cx40, όπου το τμήμα QRS που αντιστοιχεί στη μετάδοση παλμών από τις ίνες του Purkinje στις κοιλίες είναι αισθητά αυξημένο. [49]

λύνεται από τα δυναμικά δράσης που φτάνουν από τον δεξιό κόλπο. Αφού φύγουν από τον κολποκοιλιακό κόμβο, τα δυναμικά διαπερνούν το τοίχωμα μεταξύ των δύο κοιλιών μέσω των ινών του δερματίου His. Το δερμάτιο His διαιρείται σε δεξιό και αριστερό κλάδο, οι οποίοι μπαίνουν στα τοιχώματα των δύο κοιλιών. Αυτές οι ίνες, με τη σειρά τους, έρχονται σε επαφή με τις ίνες του Purkinje, οι οποίες είναι μεγάλες καρδιακές ίνες που κατανέμουν γρήγορα τα δυναμικά δράσης σε πολλά σημεία των κοιλιών (Εικόνα 2.26). Οι χασμοσύνδεσμοι επιταχύνουν και συγχρονίζουν τη μεταβίβαση των δυναμικών δράσης στο σύστημα των μυϊκών ινών His-Purkinje, με αποτέλεσμα την ομαλή λειτουργία της καρδιάς.

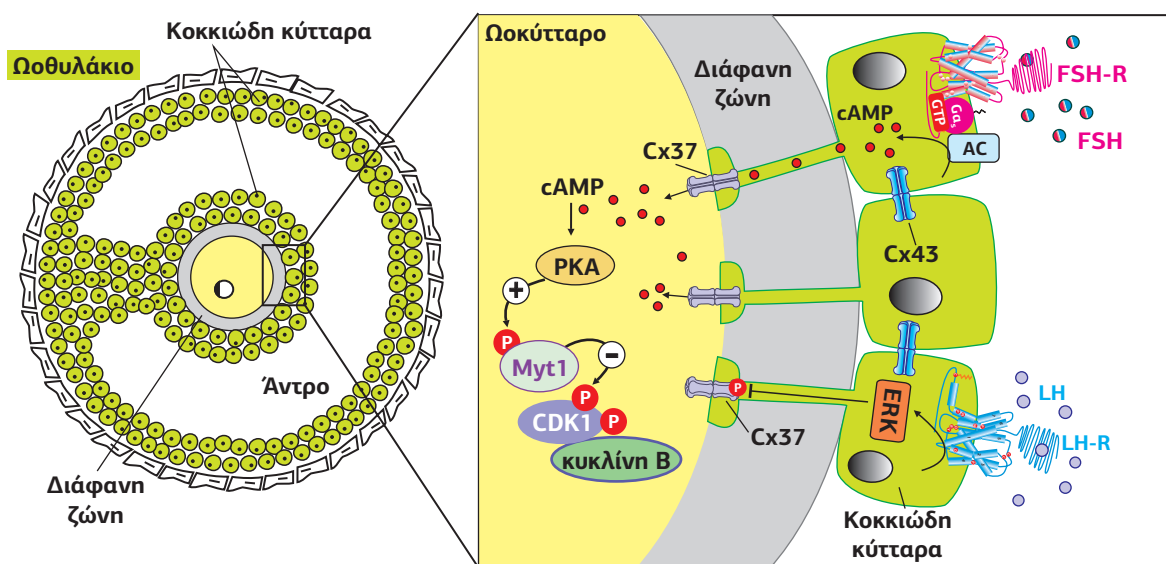
Επειδή η Cx40, η Cx43 και η Cx45 εκφράζονται σε αφθονία στους χασμοσυνδέσμους που βρίσκονται ανάμεσα στα καρδιομυοκύτταρα, η απαλοιφή των γονιδίων που τις κωδικοποιούν έχει δραστικές συνέπειες στην κολποκοιλιακή μεταβίβαση. Για παράδειγμα, σε knock out ποντίκια για την Cx40 καθυστερεί πολύ η μετάδοση των παλμών από τις ίνες του Purkinje στις κοιλίες, το οποίο φαίνεται χαρακτηριστικά στο ηλεκτροκαρδιογράφημα της Εικόνας 2.27, όπου το τμήμα QRS, που αντιστοιχεί στη μετάδοση των δυναμικών δράσης από τις ίνες του Purkinje στις κοιλίες, είναι αισθητά αυξημένο στα knock out Cx40 σε σχέση με τα άγριου τύπου.

4.6

Ανώμαλη λειτουργία των ωοθυλακίων απουσία Cx37 και Cx43

Στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα η διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των ωοθυλακίων, όπως στην ωρίμανση του ωοκυττάρου, στη δημιουργία του ωχρού σωμάτιου και στην προετοιμασία της μήτρας για την εμφύτευση του εμβρύου.

Τα ωάρια μέσα στις ωοθήκες βρίσκονται σε ανατομικές μονάδες γνωστές ως ωοθυλάκια. Τα ωοθυλάκια προέρχονται από αρχέγονα ωοθυλάκια, τα οποία αποτελούνται από ένα πρωτογενές ωοκύτταρο και ένα μονό στρώμα κοκκιωδών κυττάρων. Η περαιτέρω ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων χαρακτηρίζεται από αύξηση του μεγέθους των ωοκυττάρων, πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων σε πολλαπλές στιβάδες και τον διαχωρισμό των ωοκυττάρων από τα κοκκιώδη κύτταρα με ένα παχύ στρώμα υλικού, τη διάφανη ζώνη (zona pellucida). Παρά την ύπαρξη της διάφανης ζώνης, το εσωτερικό στρώμα των κοκκιωδών κυττάρων βρίσκεται σε στενή σχέση με το ωοκύτταρο με ένα σύστημα κυτταροπλασματικών προεκβολών, οι οποίες διασχίζουν τη διάφανη ζώνη και επικοινωνούν με το ωοκύτταρο μέσω χασμοσυνδέσμων Cx37. Επιπλέον, τα κοκκιώδη κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ



τους με χασμοσυνδέσμους Cx43, έτσι ώστε ολόκληρο το ωοθυλάκιο να λειτουργεί ως μια ολοκληρωμένη μονάδα (**Εικόνα 2.28**).

Τα ωοκύτταρα μπαίνουν στη μείωση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και σταματούν στην πρόφαση Ι έως την αναπαραγωγική ωριμότητα. Η ωρίμανση των ωοκυττάρων ενεργοποιείται από μια απότομη αύξηση της ωχρινότροπου ορμόνης (LH) που εκκρίνεται από την υπόφυση. Τα ωοκύτταρα που επιλέγονται από την LH εισέρχονται ξανά στον κυτταρικό κύκλο και ολοκληρώνουν τη μείωση μόνο εάν γονιμοποιηθούν. Έτσι, ένα ωοκύτταρο μπορεί να παραμείνει ακινητοποιημένο στη μειωτική πρόφαση για περίοδο μέχρι 40 ετών ή περισσότερο στις γυναίκες. Το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου είναι υπό τον έλεγχο της FSH, η οποία ενεργοποιεί τους FSH-Rs των κοκκιωδών κυττάρων του ωοθυλακίου. Επιπλέον, μόνο τα κοκκιώδη κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς της LH. Συνεπώς, η επικοινωνία των κοκκιωδών κυττάρων με το ωοκύτταρο είναι ζωτικής σημασίας για τη μειωτική στάση και για την ενεργοποίηση της περαιτέρω ωρίμανσης του ωοκυττάρου.

Το σταμάτημα του ωοκυττάρου στην πρόφαση Ι εξαρτάται από την υψηλή συγκέντρωση του cAMP, το οποίο παράγεται μέσω του ενεργοποιημένου FSH-R. Το cAMP εισέρχεται στο ωοκύτταρο από τα κοκκιώδη μέσω των χασμοσυνδέσμων Cx37 και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση Myt1. Η Myt1 φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη δράση της κυκλino-εξαρτώμενης κινάσης CDK1, η οποία μαζί με την κυκλίνη B συγκροτεί τον παράγοντα προώθησης της μίτωσης, MPF (Mitosis Promoting Factor). Η LH, μέσω της MAPK3/1 (ή ERK1/2) προκαλεί μείωση της διαπερατότητας των χασμοσυνδέσμων Cx37, αλλά όχι των Cx43. Η φωσφορυλίωση των κοννεξινών Cx37 οδηγεί στο κλείσιμο των χασμοσυνδέσμων αναστέλλοντας τη μεταφορά του cAMP στο ωοκύτταρο. Όταν η συγκέντρωση cAMP μειώνεται, η PKA απενεργοποιείται, με επακόλουθη την ενεργοποίηση του MPF και την προώθηση της μείωσης.

Σε *knock out* Cx37 ποντίκια η ωρίμανση του ωοθυλακίου σταματά σε ένα στάδιο πριν από τη δημιουργία του άντρου. Τα ωοκύτταρα αυτών των ποντικών δεν φτάνουν ποτέ σε φυσιολογικό μέγεθος ούτε είναι ικανά να συνεχίσουν τη μείωση. Τα *knock out* Cx43 ποντίκια πεθαίνουν λίγο μετά τη γέννηση ως αποτέλεσμα καρδιακής δυσλειτουργίας αποκλείοντας τον προσδιορισμό του ρόλου τους στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Για να μελετηθεί ο ρόλος της απουσίας της Cx43 στην ωρίμανση του ωοθυλακίου, ξεπερνώντας το πρόβλημα της θνησιμότητας, οι ωοθήκες αφαιρούνται πριν από τη γέννηση και αναπτύσσονται *in vitro*. Σε αυτήν την περίπτωση τα κοκκιώδη κύτταρα αδυνατούν να αναπτυχθούν σωστά και το ωοκύτταρο δεν είναι ικανό να ολοκληρώσει τη μείωση (**Εικόνα 2.29**).

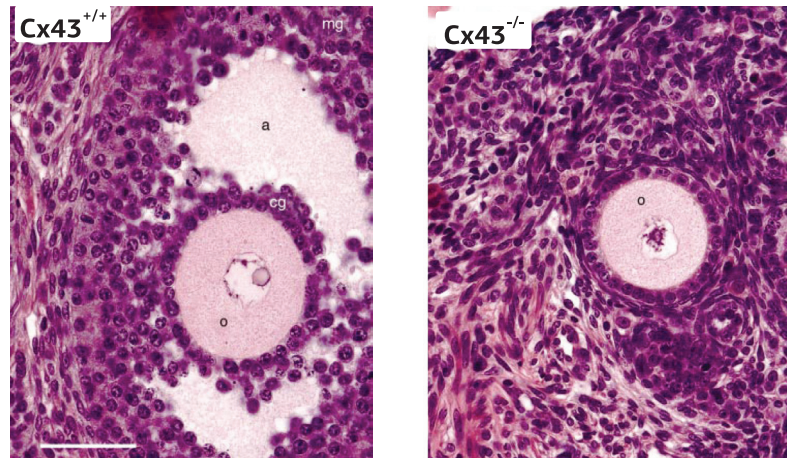
Εικόνα 2.28

Σύνδεση των κυττάρων του ωοθυλακίου μέσω χασμοσυνδέσμων. Το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο αποτελείται από το ωοκύτταρο και ένα στρώμα κοκκιωδών κυττάρων, το οποίο διαχωρίζεται από το ωοκύτταρο με ένα παχύ στρώμα υλικού, τη διάφανη ζώνη. Το εσωτερικό στρώμα των κοκκιωδών κυττάρων βρίσκεται σε στενή σχέση με το ωοκύτταρο με ένα σύστημα κυτταροπλασματικών προεκβολών, οι οποίες διασχίζουν τη διάφανη ζώνη και επικοινωνούν μέσω χασμοσυνδέσμων Cx37 με το ωοκύτταρο. Τα κοκκιώδη κύτταρα, επίσης, επικοινωνούν μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους Cx43. [49]

Εικόνα 2.29

Ανώμαλη ωοθυλακιογένεση σε ωοθήκες Cx43 knockout. Οι ωοθήκες από έμβρυα, από τα οποία απουσιάζουν οι Cx43, μεταμοσχεύθηκαν πριν το τέλος της κύησης στα νεφρά ενήλικων ανοσοκατεσταλμένων θηλυκών.

Οι ωοθήκες από έμβρυα άγριου τύπου ομοίως ανοσοκατεσταλμένων χρησιμεύουν ως μάρτυρες. Στα knockout ποντίκια Cx43^{-/-} τα κοκκιώδη κύτταρα δεν αναπτύσσονται σωστά και το ωοθυλάκιο σταματά στο στάδιο πριν τον σχηματισμό του άντρου. [32]



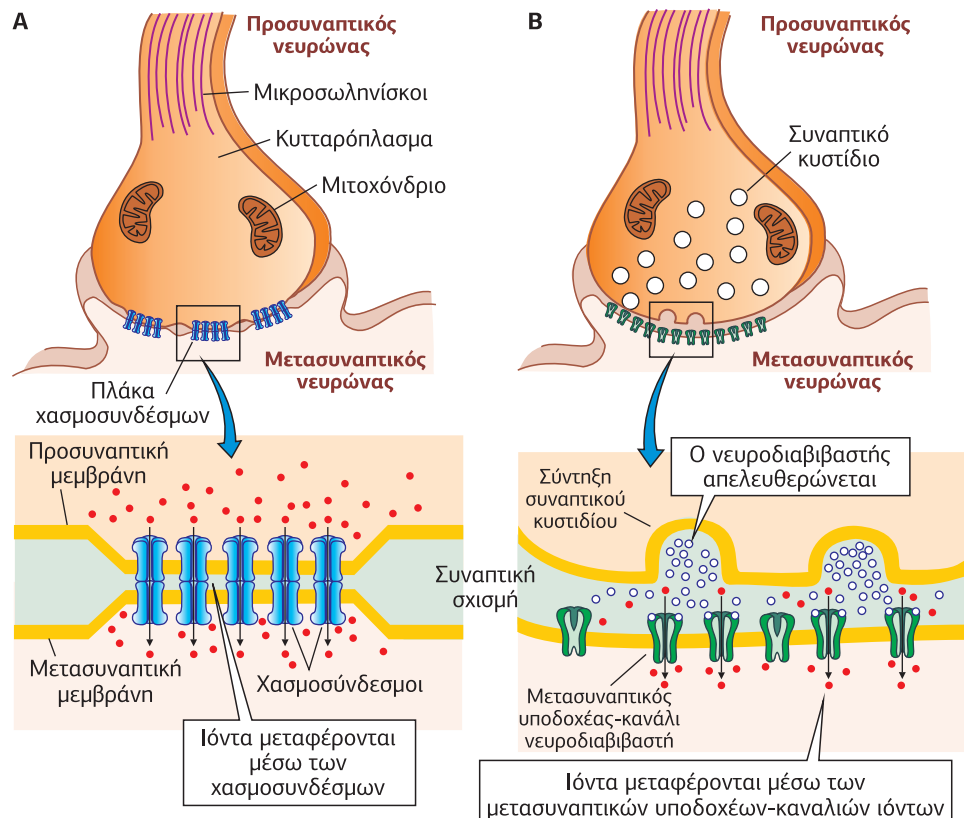
5. Ο ρόλος των χασμοσυνδέσμων στο νευρικό σύστημα

Η μεταφορά των σημάτων και η επικοινωνία στο νευρικό σύστημα, ανάμεσα στα νευρικά αλλά και στα νευρογλοιακά κύτταρα, πραγματοποιείται από τον προσυναπτικό νευρώνα με δύο ειδών συνάψεις: τις **χημικές συνάψεις**, στις οποίες απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή ένας νευροδιαβιβαστής και, στη συνέχεια, συνδέεται σε μεμβρανικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρώνα μεταφέροντας το μήνυμα, και τις **ηλεκτρικές συνάψεις**, οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία χασμοσυνδέσμων μεταξύ των προσυναπτικών και μετασυναπτικών νευρώνων, μέσω των οποίων μεταφέρεται άμεσα ο νευρικός παλμός (**Εικόνα 2.30**). Οι χημικές συνάψεις είναι οι πιο διαδεδομένες στα σπονδυλωτά και η μοριακή τους δομή έχει εξετασθεί εκτενώς, σε αντίθεση με τον ρόλο των χασμοσυνδέσμων που συγκριτικά έχει παραμεληθεί.

Εικόνα 2.30

Η επικοινωνία στο νευρικό σύστημα πραγματοποιείται μέσω χημικών και ηλεκτρικών συνάψεων.

A. Οι ηλεκτρικές συνάψεις εξαρτώνται από την παρουσία χασμοσυνδέσμων μεταξύ των προσυναπτικών και μετασυναπτικών νευρώνων, μέσω των οποίων μεταφέρονται ιόντα. **B.** Στις χημικές συνάψεις απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα ένας νευροδιαβιβαστής, ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται σε μεμβρανικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρώνα. Στην εικόνα διακρίνεται ένας υποδοχέας-κανάλι διαμέσου του οποίου εισέρχονται ιόντα στον μετασυναπτικό νευρώνα.



Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) εκφράζει 11 διαφορετικές κοννεξίνες και είναι έντονα συνδεδεμένο μέσω του δικτύου χασμοσυνδέσμων. Οι κοννεξίνες Cx26, 30, 32, 36, 37, 40, 43 και 45 εκφράζονται στον εγκέφαλο με ένα μοναδικό πρότυπο έκφρασης η καθεμία κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Ολόκληρες ομάδες νευρώνων είναι δυνατόν να συνδέονται μέσω ηλεκτρικών συνάψεων και με τον τρόπο αυτό να δρουν ως ένα συγκύτιο. Τα κύτταρα αυτά μπορεί μάλιστα να έχουν υψηλό ουδό νευρικής διέγερσης, αλλά μόλις αυτός ξεπεραστεί, αποδίδουν τη νευρική ώση με εκρηκτικό τρόπο, σύμφωνα με τον νόμο του όλα ή τίποτα.

5.1

Χασμοσύνδεσμοι στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού

Οι ηλεκτρικές συνάψεις και ο ρόλος των χασμοσυνδέσμων έχουν καλύτερα μελετηθεί στα κύτταρα του αμφιβληστροειδή χιτώνα, ο οποίος είναι μέρος του ΚΝΣ, η συναπτική του οργάνωση είναι όμοια με εκείνη άλλων δομών του ΚΝΣ και ταυτόχρονα είναι σχετικά απλός, συγκρινόμενος με άλλες περιοχές του εγκεφάλου.

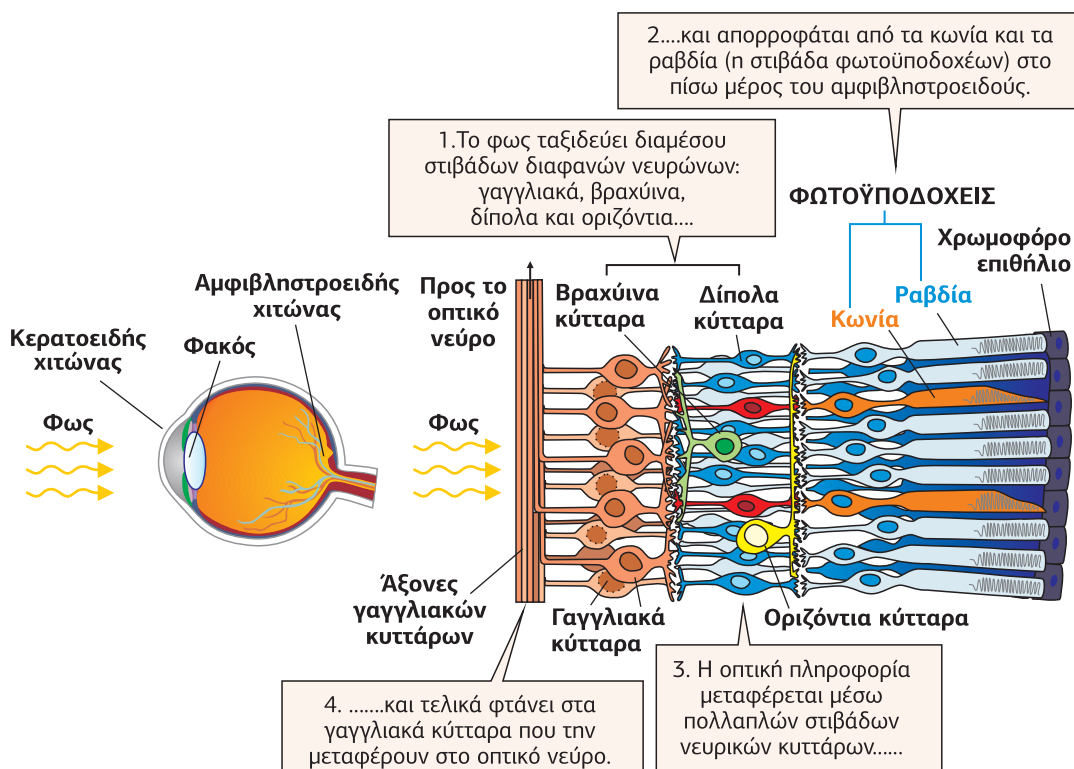
Ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από έξι τύπους νευρικών κυττάρων. Τα φωτοευαίσθητα κύτταρα (τα **ραβδία** και τα **κωνία**) μετατρέπουν το οπτικό ερέθισμα σε δυναμικά δράσης, τα οποία μεταφέρονται στον οπτικό φλοιό του εγκεφάλου μέσω των **γαγγλιακών κυττάρων**, οι άξονες των οποίων σχηματίζουν το οπτικό νεύρο. Μεταξύ των φωτοευαίσθητων και των γαγγλιακών κυττάρων υπάρχουν τρεις κατηγορίες διαμέσων νευρώνων: τα **οριζόντια**, τα **δίπολα** και τα **βραχύνια (amacrine) κύτταρα** (Εικόνα 2.31). Τα κύτταρα αυτά δεν μεταδίδουν απλώς τα σήματα από τους φωτοϋποδοχείς στα γαγγλιακά, αλλά και συνδυάζουν τα σήματα από διαφορετικούς φωτοϋποδοχείς, έτσι ώστε οι ηλεκτρικοί παλμοί που παράγονται από τα γαγγλιακά να εξαρτώνται απολύτως από τα ακριβή χωρικά και χρονικά χαρακτηριστικά του φωτός που ερεθίζει τον αμφιβληστροειδή.

Όλα τα είδη κυττάρων του αμφιβληστροειδή συνδέονται μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους. Οι χασμοσύνδεσμοι συμμετέχουν στη μετάδοση των νευρικών

Εικόνα 2.31

Δομή του αμφιβληστροειδούς.

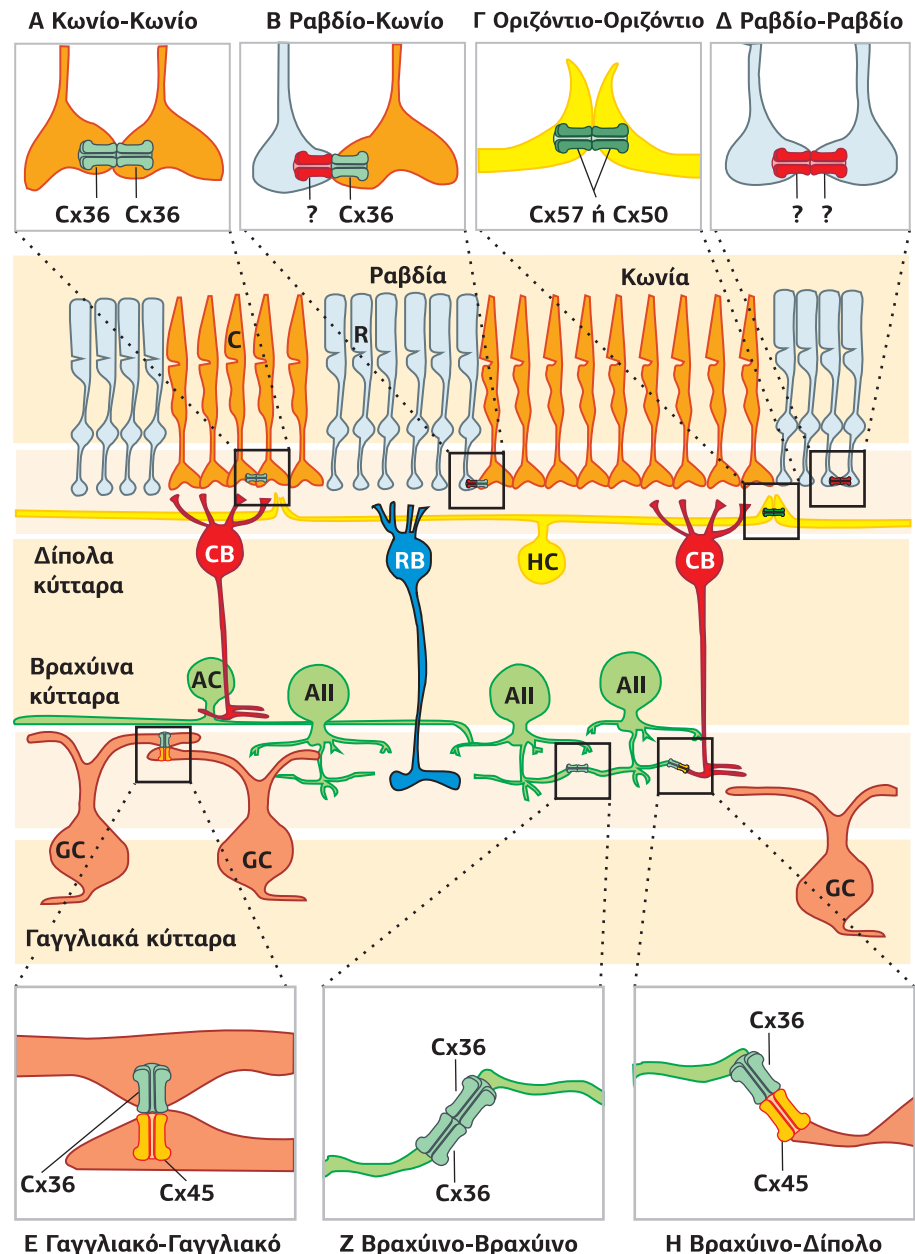
Το φως εισέρχεται διαμέσου του κερατοειδούς χιτώνα, περνάει μέσα από το υδατοειδές υγρό, την κόρη, το υαλώδες υγρό και την πρόσθια επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς, πριν καταλήξει στα κωνία και στα ραβδία. Τα φωτοϋποδοχτικά αυτά κύτταρα επικοινωνούν με τα γαγγλιακά κύτταρα μέσω τριών τύπων διαμέσων νευρώνων, τα οριζόντια, τα δίπολα και τα βραχύνια (amacrine).

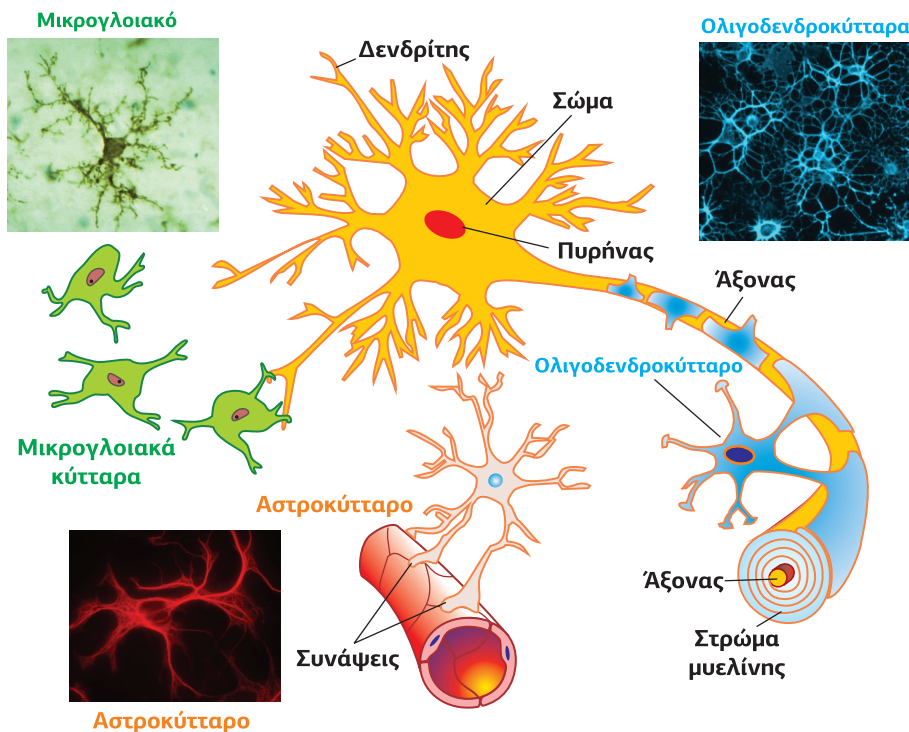


σημάτων, ενώ παράλληλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και την κωδικοποίηση των οπτικών σημάτων κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Η σύνδεση των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων με χασμοσυνδέσμους συμβάλλει στη βελτίωση του σήματος και την ελάττωση του “θορύβου”.

Η κοννεξίνη που κυριαρχεί στον αμφιβληστροειδή είναι η **Cx36**. Τα γειτονικά κωνία επικοινωνούν μεταξύ τους, αλλά και με τα γειτονικά ραβδία με χασμοσυνδέσμους Cx36. Ο τύπος κοννεξινών στη σύνδεση ραβδίων-ραβδίων παραμένει άγνωστος. Οι δενδρίτες των οριζόντιων κυττάρων είναι εκτεταμένα συνδεδεμένοι με χασμοσυνδέσμους Cx50 και/ή Cx57. Όλα τα βραχύινα (amacrine) κύτταρα τύπου AII σχηματίζουν ομομερείς και ομοτυπικούς ημιδαύλους κοννεξινών Cx36, ενώ αντίθετα, χασμοσύνδεσμοι ανάμεσα σε βραχύινα και δίπολα κύτταρα ON κωνίων μπορεί να είναι ομοτυπικοί ή ετεροτυπικοί Cx36 και/ή Cx45. Τα γαγγλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους και με τα βραχύινα με Cx36 ή Cx45 (**Εικόνα 2.32**). Σήματα από ραβδία knockout Cx36 δεν φτάνουν ποτέ στα γαγγλιακά, επισμαίνοντας τον κεντρικό ρόλο των χασμοσυνδέσμων στη φωτοδιαβίβαση.

Εικόνα 2.32
Παραδείγματα ηλεκτρικών συνάψεων στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς.
Α. Και οι δύο ημιδαύλοι των γειτονικών κωνίων (C-C) συγκροτούνται από Cx36.
Β. Οι χασμοσύνδεσμοι ραβδίων-κωνίων (R-C) αποτελούνται από Cx36 (στα κωνία) και από άγνωστη κοννεξίνη από την πλευρά των ραβδίων.
Γ. Οι δενδρίτες των γειτονικών οριζόντιων κυττάρων (HC) είναι εκτεταμένα συνδεδεμένοι μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους Cx50 και/ή Cx57.
Δ. Ο τύπος κοννεξινών στους χασμοσυνδέσμους ραβδίων-ραβδίων παραμένει άγνωστος.
Ε. Τα γαγγλιακά (GC) συνδέονται μεταξύ τους και με τα βραχύινα (amacrine) (AC) με Cx36 ή Cx45.
Ζ/Η. Όλα τα βραχύινα κύτταρα τύπου AII σχηματίζουν δύο τύπους χασμοσυνδέσμων: οι χασμοσύνδεσμοι μεταξύ βραχύνων (amacrine) AII είναι ομομερείς και ομοτυπικοί ημιδαύλοι Cx36, ενώ αντίθετα, χασμοσύνδεσμοι ανάμεσα σε βραχύινα και δίπολα κύτταρα ON κωνίων (CB) μπορεί να είναι ομοτυπικοί ή ετεροτυπικοί Cx36 και/ή Cx45. [10]



**Εικόνα 2.33**

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από 3 κύριες ομάδες γλοιακών κυττάρων:

1. τα ολιγοδενδροκύτταρα (στο ΚΝΣ) και τα κύτταρα Schwann (στο Περιφερικό ΝΣ), και τα δύο παράγουν μυελίνη και περιβάλλουν τους άξονες των νευρώνων,
2. τη μικρογλοία, τα ανοσοποιητικά κύτταρα του νευρικού συστήματος και
3. τα αστροκύτταρα, τα οποία παίζουν κύριο ρόλο στη θρέψη των νευρώνων και στην επιτυχή επεξεργασία και μεταγωγή σήματος.

Οι χασμοσύνδεσμοι ρυθμίζονται δυναμικά από τον εξωτερικό φωτισμό (ηλιοφάνεια, συννεφιά, σκοτάδι) και από τον κερκτικό ρυθμό μέσω φωτο-ενεργοποιούμενων νευρορρυθμιστών, όπως η ντοπαμίνη και το οξείδιο του αζώτου, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τη χασμοσυνδεσμική επικοινωνία. Για παράδειγμα, στο σκοτάδι, αλλά και στο έντονο φως, οι περισσότεροι χασμοσύνδεσμοι είναι κλειστοί, ενώ ανοίγουν στο αμυδρό φως επιτρέποντας την ενεργοποίηση περισσότερων αμακρινών κυττάρων για καθαρότερη όραση (βλ. σελ. 79).

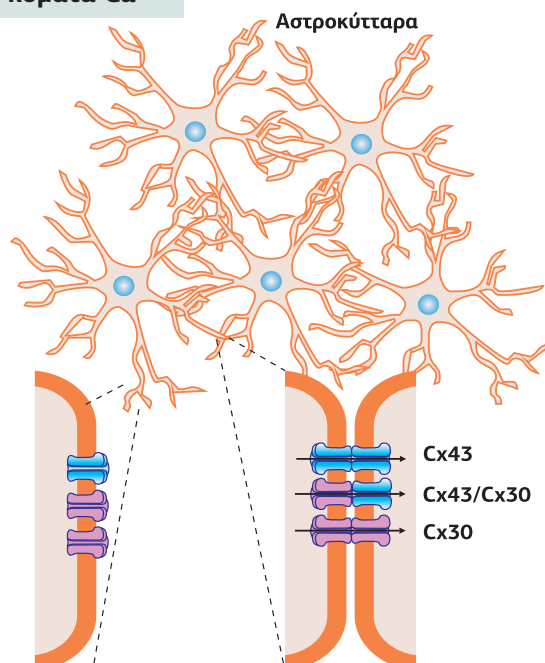
Εικόνα 2.34

Το κάθε αστροκύτταρο εκφράζει περισσότερα από ένα είδος κοννεξίνης. Κυρίαρχες κοννεξίνες είναι η Cx43 (μπλε) και η Cx30 (μώβ). [21]

5.2 | Χασμοσύνδεσμοι στα κύτταρα της γλοίας και τα “κύματα Ca^{2+} ”

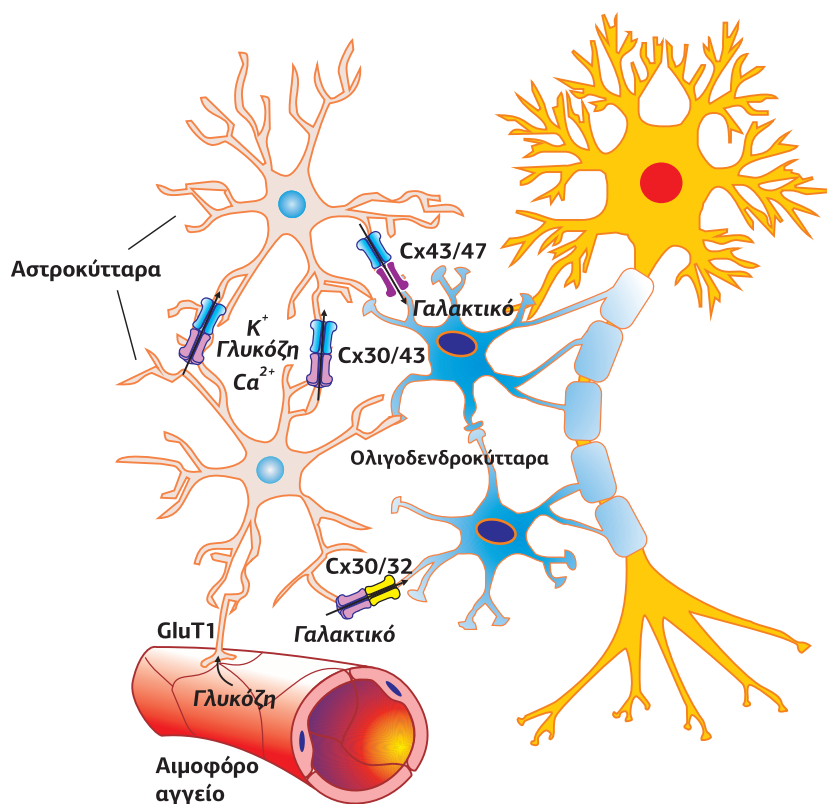
Το νευρικό σύστημα αποτελείται από νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα, με τον αριθμό των νευρογλοιακών να ξεπερνά κατά πολύ αυτόν των νευρώνων. Υπάρχουν 3 κύριες ομάδες γλοιακών κυττάρων: 1. τα **ολιγοδενδροκύτταρα** (στο ΚΝΣ) και τα κύτταρα Schwann (στο Περιφερικό ΝΣ), και τα δύο παράγουν μυελίνη και περιβάλλουν τους άξονες των νευρώνων, 2. η **μικρογλοία**, τα ανοσοποιητικά κύτταρα του νευρικού συστήματος και 3. τα **αστροκύτταρα**, τα οποία βρίσκονται παντού στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό, είναι τα κυρίαρχα κύτταρα ως προς τον αριθμό τους, την έκταση της επιφάνειας που καταλαμβάνουν και τον όγκο τους και παίζουν κύριο ρόλο στην τροφοδοσία των νευρώνων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων νευρώνων και στη ρύθμιση της συναπτικής νευρωνικής επικοινωνίας (**Εικόνα 2.33**).

Χασμοσύνδεσμοι έχουν βρεθεί τόσο μεταξύ νευρογλοιακών κυττάρων του ίδιου είδους (αστροκυττάρων - αστροκυττάρων και ολιγοδενδροκυττάρων - ολιγοδενδροκυττάρων), αλλά και διαφορετικού είδους (αστροκυττάρων - ολιγοδενδροκυττάρων). Τα αστροκύτταρα είναι τα κύτταρα του εγκεφάλου που



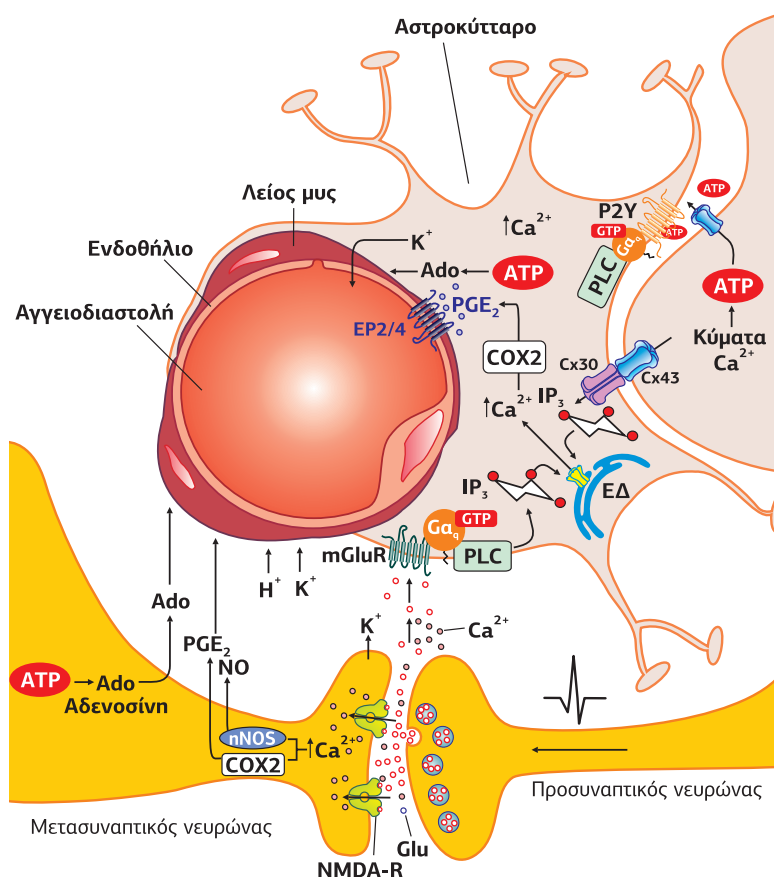
Εικόνα 2.35

Στο ΚΝΣ, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους αποτελεσματικά και εξειδικευμένα μέσω χασμοσυνδέσμων και συμμετέχουν στη μεταβολική υποστήριξη των νευρώνων. Η γλυκόζη εισέρχεται μέσω του μεταφορέα GluT1 από την κυκλοφορία του αίματος στα αστροκύτταρα και μεταφέρεται άμεσα σε όλα τα αστροκύτταρα μέσω των χασμοσυνδέσμων Cx30/43. Στα αστροκύτταρα μετατρέπεται σε γαλακτικό, το οποίο μεταφέρεται στα ολιγοδενδροκύτταρα μέσω των Cx43/47 και Cx30/32. [41]

**Εικόνα 2.36**

Η ανίχνευση της νευρωνικής δραστηριότητας από τα αστροκύτταρα μεταφράζεται μέσω των κυμάτων Ca^{2+} σε άμεση τοπική αγγειοδιαστολή.

Το γλουταμινικό (Glu) που απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα συνδέεται στους ιοντοτροπικούς NMDA υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρώνα, αλλά και στους μεταβολοτροπικούς γλουταμινικούς υποδοχείς (mGluRs) των αστροκυττάρων. Η ενεργοποίηση των mGluRs οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLC, στην παραγωγή IP_3 και στην αύξηση του Ca^{2+} , το οποίο επάγει την απελευθέρωση αγγειοδραστικών ουσιών (προσταγλανδίνες PGE_2), που οδηγούν σε αγγειοδιαστολή μέσω του EP2/4 υποδοχέα της. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} επιτείνεται από τη δράση του ATP (το οποίο απελευθερώνεται από ημιδιαύλους κόννεξινών) στους πουρινοϋποδοχείς (P2X, P2Y) γειτονικών αστροκυττάρων. Τα ιόντα Ca^{2+} μεταφέρονται μέσω των χασμοσυνδέσμων σε όλα τα συνδεδεμένα αστροκύτταρα ως κύματα Ca^{2+} που οδηγούν σε άμεση τοπική αγγειοδιαστολή. [5]



εκφράζουν τη μεγαλύτερη ποσότητα Cxs. Το κάθε κύτταρο εκφράζει περισσότερα από ένα είδος κοννεξίνης, ενώ κυρίαρχες κοννεξίνες είναι οι Cx43 και Cx30 (Εικόνα 2.34).

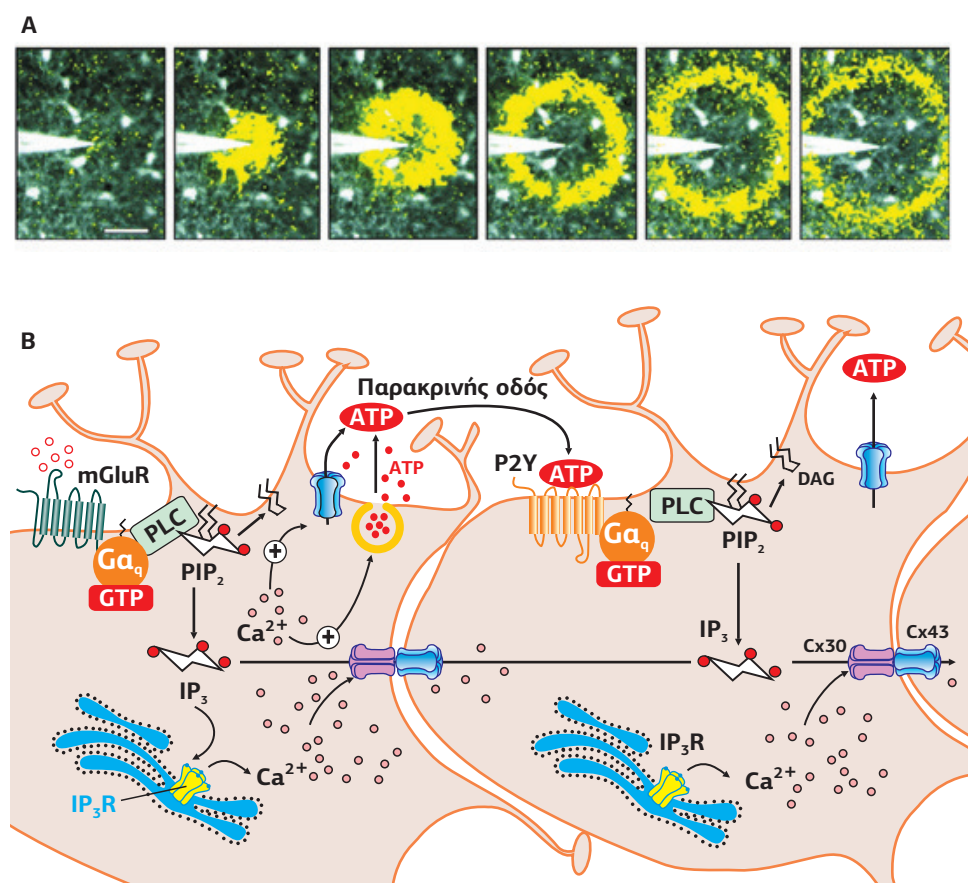
Ο κύριος ρόλος των αστροκυττάρων είναι η τροφοδοσία των νευρώνων με θρεπτικά συστατικά. Η σύναψη αστροκυττάρων με τα τριχοειδή αγγεία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1800 από τον Camillo Golgi και ήταν η ένδειξη ότι τα αστροκύτταρα προσλαμβάνουν θρεπτικά και μεταβολίτες από το αίμα για να τα μεταφέρουν στους νευρώνες. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ο κρίσιμος ρόλος των χασμοσυνδέσμων μεταξύ των αστροκυττάρων, αλλά και των ολιγοδενδροκυττάρων στη μεταβολική υποστήριξη των νευρώνων (Εικόνα 2.35).

Οι αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια των δραστήριων νευρώνων απαιτούν και αύξηση της ροής του αίματος στην περιοχή της αυξημένης νευρωνικής δραστηριότητας. Η τοπική αύξηση της αιματικής ροής μέσα σε msec εξασφαλίζει ότι οι ενεργοί νευρώνες θα λάβουν την απαραίτητη ποσότητα οξυγόνου και μεταβολιτών, γι' αυτό και κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης παράγονται και πολλοί αγγειοδραστικοί παράγοντες. Σε αυτήν τη ρύθμιση της τοπικής μικροκυκλοφορίας παίζει σημαντικό ρόλο η σηματοδότηση μεταξύ νευρώνων-αστροκυττάρων. Για παράδειγμα, όταν ο προσυναπτικός νευρώνας απελευθερώνει γλουταμινικό (Glu), αυτό συνδέεται στους γλουταμινεργικούς μεταβιοτροπικούς υποδοχείς (GPCRs) στα αστροκύτταρα, οι οποίοι μέσω της G_{aq} ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C, διεγείροντας την παραγωγή τριφωσφορικής ινositόλης (IP_3), η οποία οδηγεί με τη σειρά της στην έξοδο Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} διαδίδεται ταχύτητα σε όλα τα συνδεδεμένα με χασμοσυνδέσμους αστροκύτταρα, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο τα "κύματα Ca^{2+} ", των οποίων η συχνότητα είναι ανάλογη της νευρωνικής δραστηριότητας. Αυτά τα κύματα δείχνουν ότι τα αστροκύτταρα είναι αισθητήρες της νευρωνικής δραστηριότητας, καθώς μεταφέρονται γρήγορα στη σύναψη αστροκυττάρου-τριχοειδούς, προκαλώντας τη διαστολή

Εικόνα 2.37

Κύματα ασβεστίου.

A. Μηχανική διέγερση ενός αστροκυττάρου στο κέντρο του οπτικού πεδίου προκαλεί τοπική αύξηση του Ca^{2+} , η οποία στη συνέχεια μεταφέρεται στα γειτονικά κύτταρα. Στην αλληλουχία αυτή, οι εικόνες λήφθηκαν σε διαστήματα 0,93 sec και με κίτρινο φαίνεται η μεταφορά του κύματος Ca^{2+} . B. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} σε ένα αστροκύτταρο μεταφέρεται ως κύματα ασβεστίου σε μια ομάδα αστροκυττάρων μέσω τριών μηχανισμών: 1. τα ιόντα Ca^{2+} διαμέσου των χασμοσυνδέσμων διαχέονται άμεσα στα γειτονικά αστροκύτταρα, 2. η IP_3 , η οποία ενεργοποιώντας τους υποδοχείς IP_3Rs επιτείνει την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , μεταφέρεται και αυτή μέσω των χασμοσυνδέσμων και τέλος 3. ενεργοποιείται η απελευθέρωση του ATP (είτε Ca^{2+} -εξαρτώμενα μέσω κυστιδίων είτε μέσω ημιδιαύλων), το οποίο δρα παρακρινώς στους γειτονικούς πουρινεργικούς υποδοχείς διεγείροντας με τη σειρά του την αύξηση της IP_3 και του Ca^{2+} . Ο κάθε μηχανισμός μπορεί να συμβεί μεμονωμένα ή συνεργατικά. [26]



των αγγείων μέσω της απελευθέρωσης της προσταγλανδίνης E_2 (PGE_2). Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} επιτείνεται μέσω απελευθέρωσης ATP από ημιδιαύλους κοννεξινών. Το ATP δρα ως παρακρινής διαμεσολαβητής, συνδέεται στους πουρινοϋποδοχείς ($P2X$, $P2Y$) των γειτονικών αστροκυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα την επιπλέον αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} (**Εικόνα 2.36**).

Η διάδοση των κυμάτων Ca^{2+} στα αστροκύτταρα εξαρτάται από δύο παράλληλους μηχανισμούς, οι οποίοι εξαρτώνται από διαύλους ή ημιδιαύλους κοννεξινών: 1. τη διάχυση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) μέσω των χασμοσυνδέσμων που ενώνουν άμεσα το κυτταρόπλασμα γειτονικών αστροκυττάρων και 2. την παρακρινή επικοινωνία μέσω απελευθέρωσης διαβιβαστών, όπως το ATP, από ημιδιαύλους κοννεξινών (**Εικόνα 2.37**). Η ανώμαλη διακυτταρική διάδοση των κυμάτων Ca^{2+} παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η εγκεφαλική ισχαιμία, η ασθένεια Alzheimer, η επιληψία.

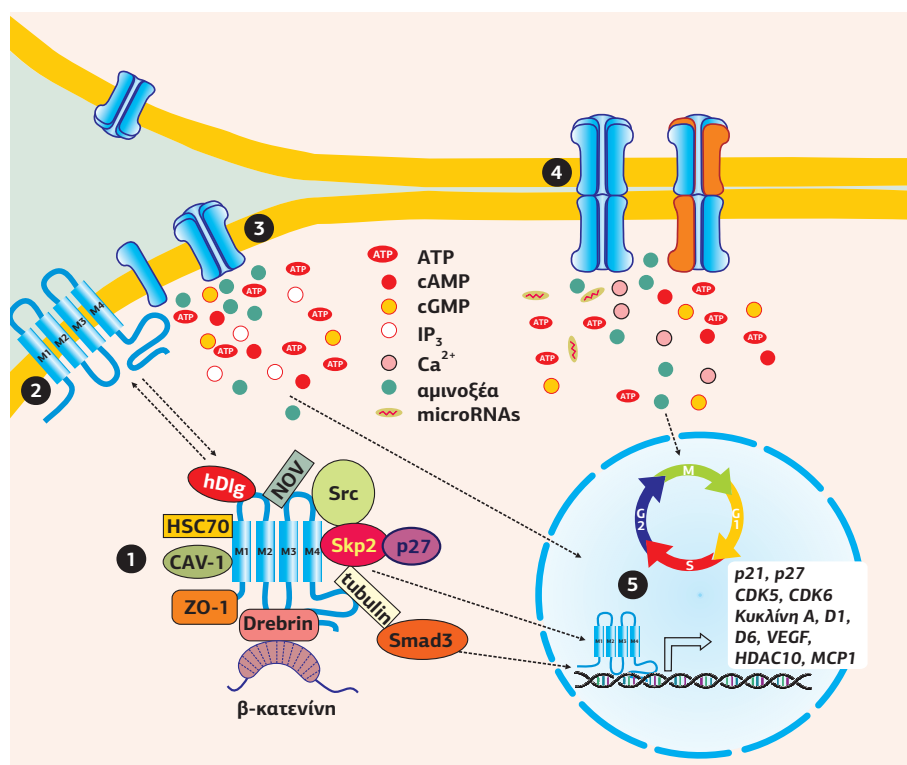
6. Ο ρόλος των χασμοσυνδέσμων στην καταστολή όγκων

Το 1966 οι Loewenstein και Kanno ανακάλυψαν ότι η ηλεκτρική σύνδεση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων ήταν ελλειμματική και έτσι υπέθεσαν ότι η διακυτταρική επικοινωνία μπορεί να ρυθμίζει πτυχές της κυτταρικής ανάπτυξης. Το 1969 με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας οι McNutt και Weinstein παρατήρησαν ανωμαλίες στη δομή των χασμοσυνδέσμων σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Με την πάροδο του χρόνου, οι παρατηρήσεις σχετικά με τη δομή των χασμοσυνδέσμων και την ενδοκυτταρική επικοινωνία συνδυάστηκαν για να στηρίξουν την υπόθεση ότι οι χασμοσύνδεσμοι παίζουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής μοίρας και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το 1986 η ανάπτυξη ειδικών αντισωμάτων ενάντια στους χασμοσυνδέσμους επιβεβαίωσε περαιτέρω αυτήν τη θεωρία, τεκμηριώνοντας την απώλεια χασμοσυνδέσμων κάτω από συνθήκες πολλαπλασιασμού, όπως σε καλλιιεργούμενα ηπατοκύτταρα.

Σε μια πρωτοποριακή μελέτη ο Zhu το 1991 έδειξε ότι η επιμόλυνση με cDNA Cx43 μιας κυτταρικής σειράς νευρογλοιακών κυττάρων αρουραίου προκαλούσε μείωση του πολλαπλασιασμού τους και προώθησε τη διαδεδομένη πλέον ιδέα ότι οι κοννεξίνες δρουν ως **καταστολείς όγκων**. Ωστόσο, αντικρουόμενα δεδομένα άρχισαν να εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990. Για παράδειγμα, μια βασική μελέτη του Mesnil το 1995 έδειξε ότι έκφραση της Cx26 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa, ενώ η έκφραση Cx43 προωθούσε τον πολλαπλασιασμό.

Έπειτα από πολλές πειραματικές διαδικασίες κατέστη σαφές ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν μια άναρχη χασμοσυνδεσμική διακυτταρική επικοινωνία (GJIC: Gap Junctional Intercellular Communication). Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν οι αλλαγές στην GJIC ή στην έκφραση των κοννεξινών ρυθμίζουν άμεσα τον κυτταρικό κύκλο. Για παράδειγμα, η έκφραση ογκογονιδίων, όπως του *Src*, μειώνει την GJIC και επάγει τον πολλαπλασιασμό. Παραδόξως, ορισμένα άλλα ογκογονίδια, όπως το *Ras*, επάγουν, επίσης, τον πολλαπλασιασμό αλλά αυξάνουν την GJIC και την έκφραση της Cx43. Παρομοίως, πολλά γνωστά αντι-ογκογόνα αντιδραστήρια που συνδυάζονται με μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων φαίνεται να αυξάνουν την έκφραση των κοννεξινών ή την GJIC. Αυτά τα παραδείγματα καταδεικνύουν ότι οι κοννεξίνες και η GJIC δεν είναι σαφώς οι βασικοί κινητήριοι παράγοντες του πολλαπλασιασμού, όμως, και η ρήση ότι “η συσχέτιση δεν σημαίνει απαραίτητα σχέση αιτίας” είναι ένα σημαντικό σημείο για να ληφθούν υπόψη κατά την ανάλυση των δεδομένων αυτών. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι χασμοσύνδεσμοι ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός, μπορούμε να υποθέσουμε ότι είναι ο ακόλουθος:

Οι κοννεξίνες μεμονωμένα μπορούν να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, οι οποίες

**Εικόνα 2.38**

Σηματοδοτικά μονοπάτια των κωννεξινών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Οι κωννεξίνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε στο κυτταρόπλασμα (1) είτε στην πλασματική μεμβράνη (2). Υπάρχει επίσης η ανταλλαγή ιόντων και μεταβολιτών είτε με το εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσω ημιδιαύλων κωννεξινών (3) είτε μεταξύ των κυττάρων μέσω χασμοσυνδέσμων (4), η οποία μπορεί να διαφέρει ανάλογα το είδος της κωννεξίνης ή της εξαμερούς σύνθεσης του χασμοσυνδέσμου. Όλα αυτά τα σενάρια, καθώς και οι πιθανές άμεσες δράσεις των κωννεξινών στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων (5), οδηγούν σε μια πολύπλοκη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου που έχει τελικά προ- ή αντι-πολλαπλασιαστικά αποτελέσματα και, σε ορισμένες περιπτώσεις, οδηγούν σε συγχρονισμό του κυτταρικού κύκλου.

Hsc70: Heat shock cognate 70, Cav1: caveolin1, Drebrin: μια actin-binding protein, NOV: Nephroblastoma Overexpressed (πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας), Skp2: S-phase kinase associated protein 2, Smad3: από το MADC (mothers against decapentaplegic) της *Drosophila* και SMA (Small Body Size) του *C. elegans*. [1]

σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στην πλασματική μεμβράνη. Επίσης, η ανταλλαγή ιόντων και μεταβολιτών με το εξωκυτταρικό περιβάλλον που συμβαίνει μέσω των ημιδιαύλων, ή μεταξύ των κυττάρων μέσω των χασμοσυνδέσμων, μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη σύσταση των χασμοσυνδέσμων σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Όλα αυτά τα σενάρια μαζί με την πιθανή άμεση δράση των κωννεξινών στον πυρήνα μπορεί να επηρεάσουν τη μεταγραφή γονιδίων, η οποία οδηγεί σε μια πολύπλοκη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου που έχει τελικά προ- ή αντι-πολλαπλασιαστικά αποτελέσματα και, σε μερικές περιπτώσεις, οδηγεί στον συγχρονισμό του κυτταρικού κύκλου (**Εικόνα 2.38**).

Συμπεράσματα και προοπτικές

Όλες αυτές οι ενδείξεις δείχνουν με σαφήνεια τον διευρυμένο ρόλο των χασμοσυνδέσμων (GJ) και των ημιδιαύλων κωννεξινών (HC) στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της συνολικής ομοιοστάσης των διαφόρων οργάνων και ιστών. Αν και σημαντική πρόοδος έχει συντελεστεί σχετικά με την κατανόηση του ρόλου των εξειδικευμένων κωννεξινών σε μια ποικιλία ιστών και κυττάρων, η μελλοντική πρόκληση είναι να προσδιοριστούν συγκεκριμένα μόρια που περνούν μέσω των χασμοσυνδέσμων (GJ) και των ημιδιαύλων κωννεξινών (HC) και ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία. Τα μόρια αυτά θα συμβάλουν σημαντικά στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων για την αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από ελαττωματικούς ή υπερδραστήριους χασμοσυνδέσμους ή/και ημιδιαύλους.

Βιβλιογραφία

1. Aasen T, Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation, *Cell and Tissue Research*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2014).
2. Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS, Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath, *J Cell Biol* **142**: 1095-1104 (1998).

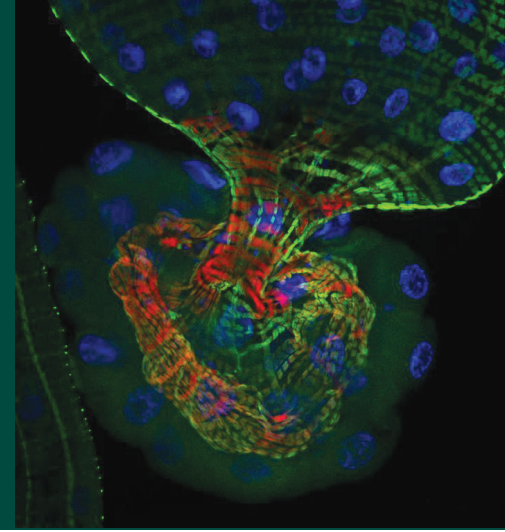
3. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap-junctions proteins, *Genomics* **83**: 706-716 (2004).
4. Becker D, Bonness V, Mobbs P, Cell coupling in the retina: Patterns and purpose, *Cell Biol Intern* **22**: 781-792 (1998).
5. Benarroch EE, Neurovascular unit dysfunction: A vascular component of Alzheimer disease? *Neurology* **68**: 1730-2 (2007).
6. Bennett M, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC, New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate, *Trends Neurosci* **26**: 610-617 (2003).
7. Berthoud VM, Minogue PJ, Laing JG, Beyer EC, Pathways for degradation of connexins and gap junctions, *Cardiovascular Research* **62**: 256-267 (2004).
8. Beyer EC, Berthoud VM, Connexin hemichannels in the lens, *Front Physiol* **5**: 20 (2014).
9. Beyer EC, Ebihara L, Berthoud VM, Connexin mutants and cataracts, *Front Pharmacol* **4**: 43 (2013).
10. Bloomfield SA, Völgyi B, The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina, *Nat Rev Neurosci* **10**: 495-506 (2009).
11. Burra S, Jiang JX, Regulation of cellular function by connexin hemichannels, *Int J Biochem Mol Biol* **2**: 119-128 (2011).
12. Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, Bennett M, Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **100**: 11388-11393 (2003).
13. Cottrell GT, Burt J, Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease, *Biochim Biophys Acta* **1711**: 126-141 (2005).
14. Czyż J, Szpak K, Madeja Z, The role of connexins in prostate cancer promotion and progression, *Nat Rev Urol* **9**: 274-282 (2012).
15. Dahl G, Muller KJ, Innexin and pannexin channels and their signaling, *FEBS Lett* **588**: 1396-402 (2014).
16. De Bock M, Decrock E, Wang N, Bol M, Vinken M, Bultynck G, Leybaert L, The dual face of connexin-based astroglial Ca²⁺ communication: A key player in brain physiology and a prime target in pathology, *Biochim Biophys Acta* **1843**: 2211-2232 (2014).
17. Dermietzel R, Spray DC, Gap Junctions, Electric Synapses, in *Neuroscience in the 21st Century*, Edited by Donald Pfaff, Springer p. 3112 (2013).
18. Duffy HS, Delmar M, Spray D, Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins, *J Physiol* **96**: 243-249 (2002).
19. Francis P, Berry V, Moore A, Bhattacharya S, Lens biology: development and human cataractogenesis, *Trends Genet* **15**: 191-196 (1999).
20. Gerido DA, White TW, Connexin disorders of the ear, skin, and lens, *Biochim Biophys Acta* **1662**: 159-170 (2004).
21. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N, Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions, *Nat Rev Neurosci* **11**: 87-99 (2010).
22. Giepmans BG, Gap junctions and connexin-interacting proteins, *Cardiovasc Res* **62**: 233-245 (2004).
23. Gilleron J, Fiorini C, Carette D, Avondet C, Falk MM, Segretain D, Pointis G, Molecular reorganization of Cx43, ZO-1 and Src complexes during the endocytosis of gap junction plaques, *J Cell Sci* **121**: 4069-4078 (2008).
24. González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A, MAGUK proteins: structure and role in tight junction, *Semin Cell Dev Biol* **11**: 315-324 (2000).
25. Goodenough DA, Paul DL, Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 285-295 (2003).
26. Haydon PG, Glia: listening and talking to the synapse, *Nat Rev Neurosci* **2**:

- 185-193 (2001).
27. Hervé JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D, Duffy HS, Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog Biophys Mol Biol* **94**: 29-65 (2007).
 28. John SA, Kondo R, Wang SY, Goldhaber JI, Weiss JN, Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition, *J Biol Chem* **274**: 236-240 (1999).
 29. Jongsma H, Wilders R, Gap junctions in cardiovascular disease, *Circ Res* **86**: 1193-1197 (2000).
 30. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (1999).
 31. Kelsell DP, Dunlop J, Hodgins MB, Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell Biol* **11**: 2-6 (2001).
 32. Kidder GM, Mhawi AA, Gap junctions and ovarian folliculogenesis, *Reproduction* **123**: 613-620 (2002).
 33. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC, Gap junction systems in the mammalian cochlea, *Brain Res Rev* **32**: 163-166 (2000).
 34. Kirchhoff F, Dringen R, Giaume C, Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in the neuroprotection, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**: 159-169 (2001).
 35. Lampe PD, Lau AF, The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication, *The Intern J Biochem Cell Biol* **36**: 1171-1186 (2004).
 36. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, 4th edition: Chapter 21 pages 935-944 (1999).
 37. Maeda S, Tsukihara T, Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions, *Cell and Mol Life Sci* **68**: 1115-1129 (2011).
 38. Martin P, Evans WH, Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions, *Cardiovasc Res* **62**: 378-387 (2004).
 39. Martínez AD, Acuña R, Figueroa V, Maripillan J, Nicholson B, Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss, *Antioxid Redox Signal* **11**: 309-22 (2009).
 40. Montero TD, Orellana JA, Hemichannels: New pathways for gliotransmitter release, *Neuroscience* **286**: 45-59 (2015).
 41. Morrison BM, Lee Y, Rothsteine JD, Oligodendroglia: metabolic supporters of axons, *Trends Cell Biol* **23**: 644-651 (2013).
 42. Naus CC, Laird DW, Implications and challenges of connexin connections to cancer, *Nat Rev Cancer* **10**: 435-441(2010).
 43. Orellana JA, Stehberg J, Hemichannels: new roles in astroglial function, *Front Physiol* **5**: 193 (2014).
 44. Pfenninger A, Wohlwend A, Kwak B, Mutations in connexin genes and disease, *European J Clin Invest* **41**: 103-116 (2011).
 45. Prochnow N, Dermietzel R, Connexons and cell adhesion: a romantic phase, *Histochem Cell Biol* **130**: 71-7 (2008).
 46. Rabionet R, Lopez-Bigas N, Arbones ML, Estivill X, Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders, *Trends Mol Med* **8**: 205-210 (2002).
 47. Rozental R, Giaume C, Spray DC, Gap junctions in the nervous system, *Brain Res Rev* **32**: 11-15 (2000).
 48. Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC, Connexin and pannexin mediated cell-cell communication, *Neuron Glia Biol* **3**: 199-208 (2007).
 49. Simon A, Goodenough D, Diverse functions of vertebrate gap junctions, *Trends Cell Biol* **8**: 477-483 (1998).
 50. Söhl G, Willecke K, Gap junctions and the connexin protein family, *Cardiovasc Res* **62**: 228-232 (2004).
 51. Solan JL, Lampe PD, Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo, *FEBS Lett* **588**: 1423-9 (2014).
 52. Sosinsky GE, Nicholson BJ, Structural organization of gap junction channels, *Biochim Biophys Acta* **1711**: 99-125 (2005).
 53. Thévenin AF, Kowal TJ, Fong JT, Kells RM, Fisher C, Falk M, Proteins and

- Mechanisms Regulating Gap-Junction Assembly, internalization and degradation, *Physiology (Bethesda)* **28**: 93-116 (2013).
54. Vander AJ, Sherman DL, Τσακόπουλος Μ, *Φυσιολογία του Ανθρώπου*, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη (2001).
55. Wanga N, De Bocka M, Decrocka E, Bola M, Gadicherlaa A, Vinkenb M, Bultynckd G, Leybaerta L, Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels, *Biochim Biophys Acta* **1828**: 35-50 (2013).
56. Xia C, Du X, Gong X, Murray A, Smart NG, Beutler B, Record for L1, MUTAGENETIX, World Wide Web URL: <http://mutagenetix.utsouthwestern.edu:80>, Accessed (2014).
57. Yeager M, Structure of cardiac gap junction intercellular channels, *J Struct Biol* **121**: 231-245 (1998).

3

Notch σηματοδότηση: Δομή των υποδοχέων Notch και ο ρόλος τους στην κυτταρική διαφοροποίηση



1. Γενικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων Notch

- 1.1 Δομή
- 1.2 Σύνθεση, μεταφορά στη μεμβράνη και ανακύκλωση του Notch

2. Περιγραφή του σηματοδοτικού μονοπατιού

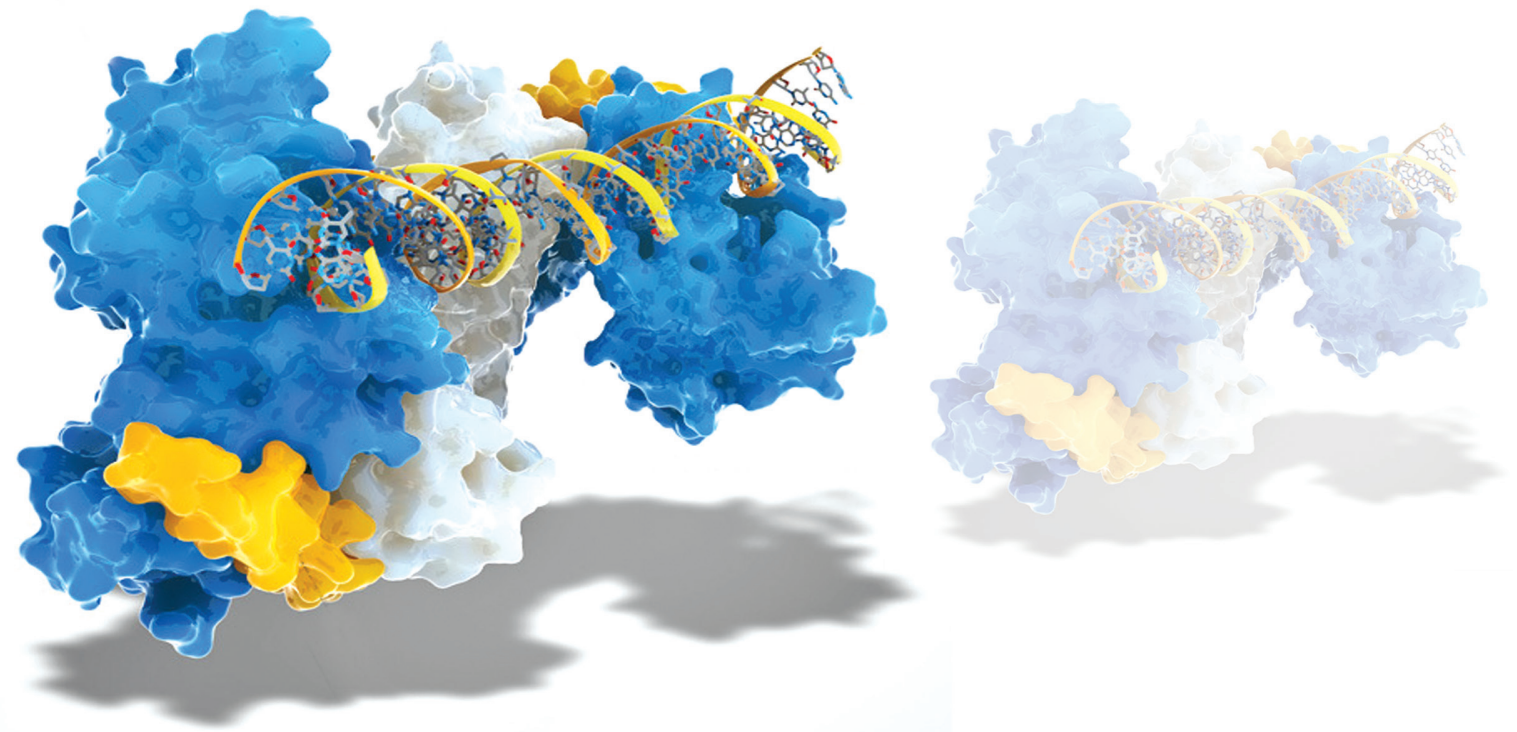
- 2.1 Αλληλεπίδραση Notch – Προσδέτη
- 2.2 Ενεργοποίηση του Notch
- 2.3 Μεταφορά του NICD στον πυρήνα και ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων

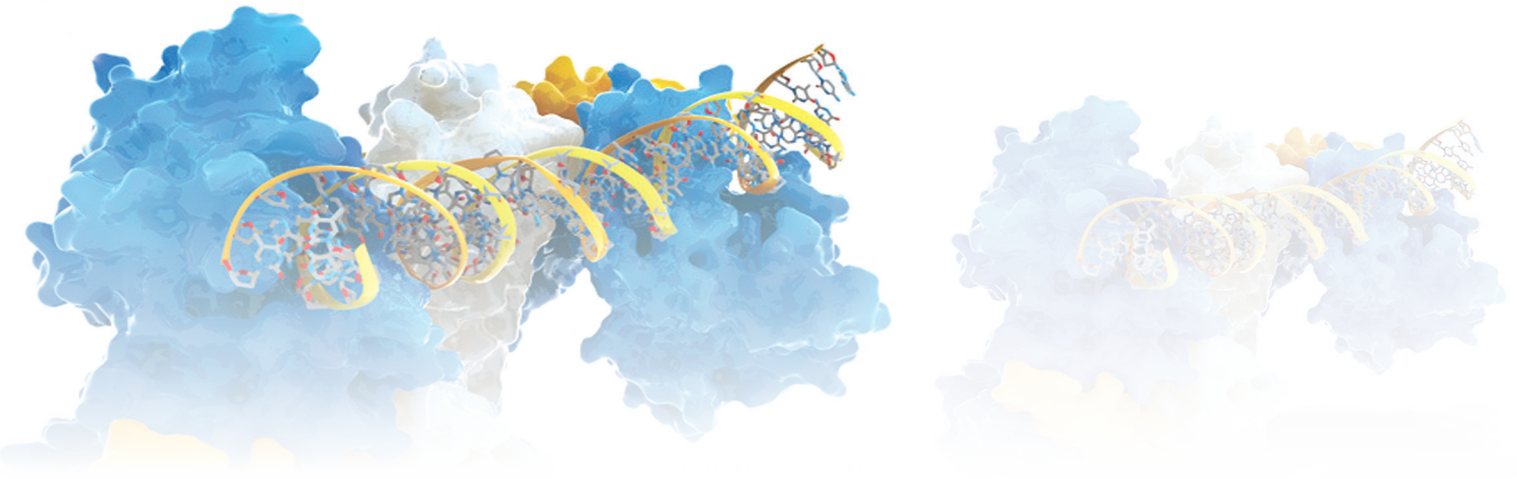
3. Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω Notch

- 3.1 Ενδοκυτταρική ρύθμιση: Ουβικουιλίνωση
- 3.2 Εξωκυτταρική ρύθμιση: Γλυκοσυλίωση

4. Ρόλος του Notch

- 4.1 Ο Notch επάγει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε νευρογλοιακά
- 4.2 Ο Notch ελέγχει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε T- και B-λεμφοκύτταρα, στον μυελό των οστών, στον θύμο και στο εντερικό επιθήλιο





1. Γενικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων Notch

Η σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων Notch αποτελεί έναν εξελικτικά παλιό μηχανισμό διακυτταρικής επικοινωνίας, ο οποίος παίζει θεμελιώδη ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες των πολυκύτταρων οργανισμών. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών κυττάρων μέσω των υποδοχέων Notch κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών, ώστε τελικά καθορίζουν τη μοίρα τους. Τα σήματα που μεταδίδονται μέσω του μεμβρανικού υποδοχέα Notch έχουν έναν μοναδικό αναπτυξιακό ρόλο: να συνδέσουν την τύχη του ενός κυττάρου με εκείνη ενός κυτταρικού γείτονα μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποδοχέα Notch και των διαμεμβρανικών του προσδετών, που εκφράζονται σε ένα από τα γειτονικά κύτταρα. Το αναπτυξιακό αποτέλεσμα της σηματοδότησης Notch εξαρτάται αυστηρά από το κυτταρικό περιβάλλον και μπορεί να επηρεάσει εκτός από την κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, παρέχοντας στον οργανισμό ένα κύριο αναπτυξιακό “εργαλείο” για τον σχηματισμό των οργάνων του και τη μορφοποίησή του.

Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι, σε όλα τα ζωικά μοντέλα που εξετάστηκαν, μεταλλάξεις στο γονίδιο *notch* που οδηγούν στην παραγωγή ανενεργών υποδοχέων προκαλούν ανεξαιρέτως αναπτυξιακές δυσλειτουργίες και φυσικά παθολογικές καταστάσεις, και στην περίπτωση του ανθρώπου.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα Notch ανακαλύφθηκε από τον John Dexter το 1914. Πήρε το όνομά του απ’ το χαρακτηριστικό οδοντωτό σχήμα που παίρνουν τα φτερά μυγών *Drosophila* (*notch* = οδοντωτός) λόγω μετάλλαξης που οδηγεί στη μερική απώλεια της λειτουργίας του υποδοχέα, *notch*^{+/−} (**Εικόνα 3.1B**). Ο ρόλος που παίζει ο υποδοχέας Notch στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση ανακαλύφθηκε το 1937 από τον Donald Poulson, ο οποίος έδειξε ότι πρόκληση αρνητικών μεταλλάξεων *notch*^{−/−} στη *Drosophila* ήταν θανατηφόρα σε εμβρυακό στάδιο, καθώς τα κύτταρα που ήταν προορισμένα να γίνουν η επιδερμίδα του ζώου έδωσαν γένεση σε κύτταρα νευρικού ιστού (**Εικόνα 3.1A**). Το 1983 το γονίδιο *notch* κλωνοποιήθηκε από τον Σπύρο Αρταβάνη-Τσάκωνα.

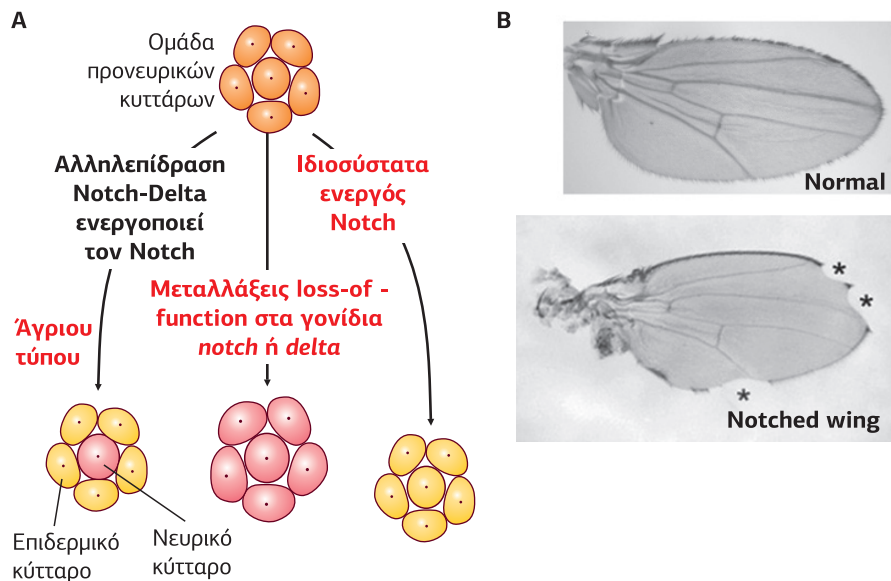
Πρωτεΐνες Notch-like ανακαλύφθηκαν και μελετήθηκαν, εκτός από τη *Drosophila*, και σε άλλους οργανισμούς: στο *Caenorhabditis elegans* (με την ονομασία LIN-12



Σπύρος Αρταβάνης-Τσάκωνας
(1946 -)

Εικόνα 3.1 Α.

Το νευρικό σύστημα αναπτύσσεται από βλαστικά εξωδερμικά κύτταρα. Κάθε μελλοντικός νευρώνας μέσω των προσδετών του (Delta) ενεργοποιεί τους υποδοχείς Notch των γειτονικών κυττάρων εμποδίζοντάς τα να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες. Ανενεργή μετάλλαξη του γονιδίου notch, οδηγεί στη διαφοροποίηση όλων των προνευρικών κυττάρων σε νευρικά, ενώ ιδιοσυστάτα ενεργοποιημένοι υποδοχείς Notch (χωρίς τη σύνδεση Delta) εμποδίζει τη δημιουργία νευρώνων. Β. Το χαρακτηριστικό οδοντωτό σχήμα που παίρνουν τα φτερά της *Drosophila* όταν υπάρχει μερική απώλεια της λειτουργίας του Notch (*notch*^{+/-}). [26]



και GLP-1), στον αχινό και σε πολλά θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Notch 1-4).

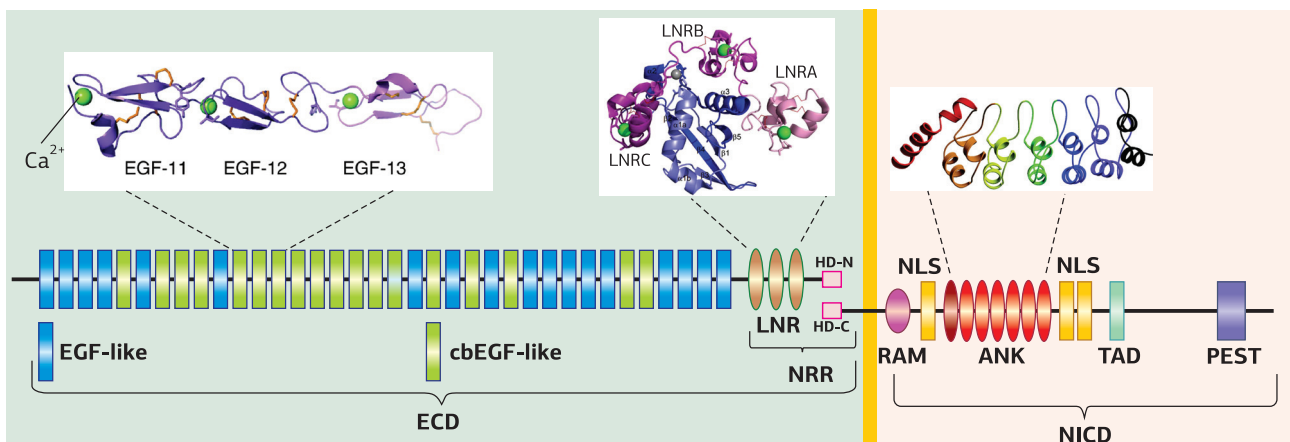
Εικόνα 3.2**Δομή του υποδοχέα Notch.**

Στο εξωκυτταρικό τμήμα του Notch (ECD) διακρίνονται οι 36 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες EGF-like, από τις οποίες με πράσινο είναι οι περιοχές που σταθεροποιούνται με τη σύνδεση του Ca^{2+} (calcium binding EGF-like), οι τρεις αλληλουχίες LNR και οι περιοχές HD-N και HD-C. Οι περιοχές LNR και HDs αποτελούν την περιοχή NRR (Negative Regulatory Domain). Στο ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch (NICD) διακρίνονται η περιοχή RAM, επτά επαναλαμβανόμενες ακολουθίες αγκυρίνης (ANK), μία περιοχή TAD, τρεις περιοχές NLS καθώς και μια ακολουθία PEST. [41] [32]

1.1**Δομή**

Ο υποδοχέας Notch είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 300 kDa, η οποία διαπερνά μόνο μία φορά την κυτταρική μεμβράνη. Το εξωκυτταρικό NH_2 -τελικό τμήμα του Notch είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του εξωτερικού μηνύματος, ενώ το ενδοκυτταρικό COOH -τελικό τμήμα για τη μετέπειτα ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων.

Η εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης αποτελείται από επαναλαμβανόμενες περιοχές-ακολουθίες αμινοξέων παρόμοιες με αυτές του EGF (Epidermal Growth Factor-like), ο αριθμός των οποίων ποικίλλει από 29 έως 36, ανάλογα με την isoμορφή του Notch (Notch της *Drosophila*, Notch1-4 στον άνθρωπο ή Lin-12 στο *Caenorhabditis elegans*). Οι περιοχές EGF-like είναι μετα-μεταφραστικά γλυκοσυλιωμένες με μια μεγάλη ποικιλία γλυκανών. Επίσης, η εξωκυτταρική περιοχή περιέχει τρεις ακολουθίες LNR (Lin12-Notch Repeat) και μια περιοχή ετεροδιμερισμού HD (Heterodimerization Domain), η οποία αποτελεί στόχο της furin-like πρωτεάσης. Μετά τη διάσπαση, το ένα τμήμα της HD, το HD-N, μένει στο NH_2 -τελικό άκρο του



Notch, ενώ το άλλο, HD-C, στο COOH-τελικό άκρο και αποτελεί στόχο της S2-πρωτεόλυσης από την ADAM.

Η ενδοκυτταρική περιοχή του Notch αποτελείται από α. μια περιοχή **RAM** 100 αα ανάμεσα στη διαμεμβρανική περιοχή και τις επαναλήψεις της αγκυρίνης, η οποία συμμετέχει στη σύνδεση με τον μεταγραφικό παράγοντα RBP-J στον πυρήνα, β. έξι επαναλήψεις αλληλουχίας **αγκυρίνης** (μοτίβα 33 αα που αποτελούνται από δύο α-έλικες που διαχωρίζονται από έναν βρόχο, και αλληλεπιδρούν με τους μεταγραφικούς παράγοντες CSL στον πυρήνα) και μια υποτιθέμενη επανάληψη έβδομης C-τελικής αλληλουχίας που παρουσιάζει ομοιότητα με τη συναινετική αλληλουχία, γ. μία περιοχή **TAD** (Transcriptional Activator Domain), ικανή να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων, δ. τρεις περιοχές **NLS** (Nuclear Localization Sequences) εκατέρωθεν των επαναλήψεων αγκυρίνης, μέσω των οποίων ο Notch προσκολλάται στο DNA στον πυρήνα, και ε. μια ακολουθία **PEST**, περιοχή πλούσια σε προλίνη (P), γλουταμινικό (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T), η οποία ρυθμίζει τον χρόνο ημιζωής του Notch (**Εικόνα 3.2**).

Εικόνα 3.3

Σύνθεση, μεταφορά στη μεμβράνη και ανακύκλωση ή αποικοδόμηση του Notch.

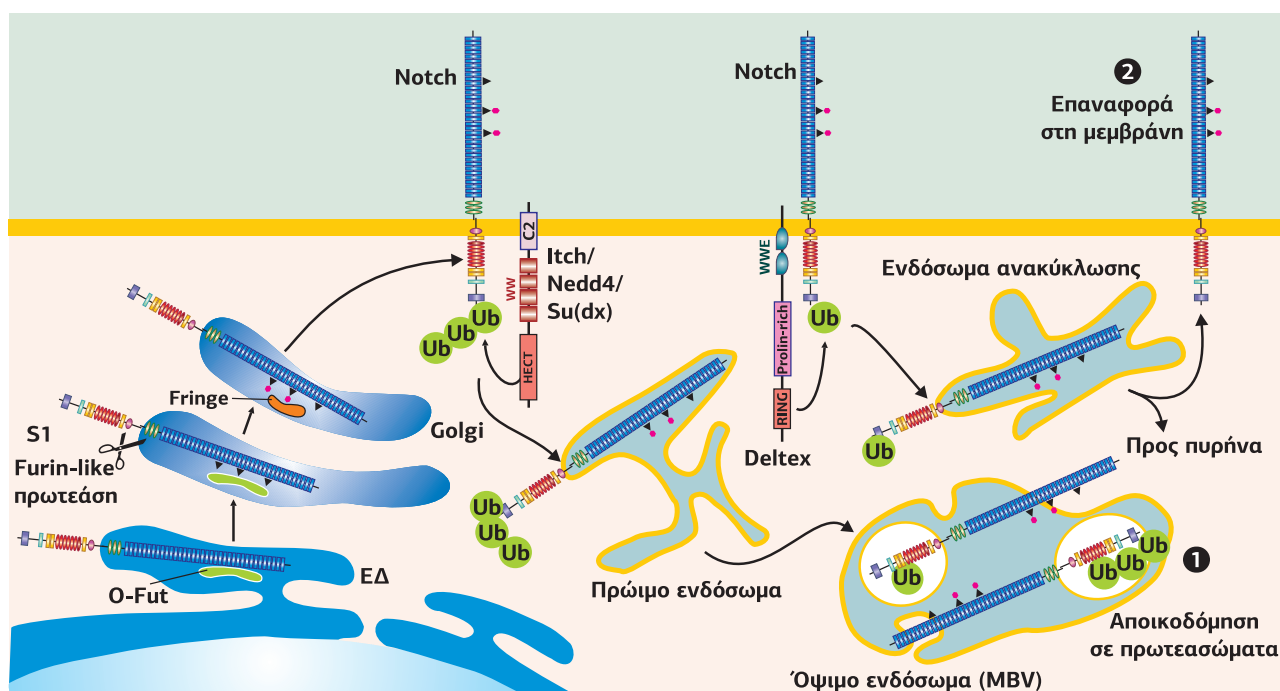
Η πρωτεΐνη Notch παράγεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου συνδέεται με την O-φουκοσυλοτρανσφεράση (O-Fut), και μεταφέρεται στο Golgi. Στο Golgi κόβεται από μια furin-like πρωτεάση σε δύο τμήματα, γλυκοσυλιώνεται από την O-Fut και από άλλες γλυκοσυλοτρανσφεράσες (π.χ. την Fringe) προτού να μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια, (χρόνος ημιζωής 3 ώρες) ο Notch ουβικουιτινώνεται από E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης [Itch, Su(dx), Nedd4], οι οποίες συνδέονται στο ενδοκυτταρικό COOH-τελικό του τμήμα και μεταφέρεται στα πρωτεασώματα, όπου θα αποικοδομηθεί. Η ουβικουιτινώνηση του Notch από την E3 λιγάση Deltex τον οδηγεί σε κυστίδια πλούσια σε συνταξίνη, τα οποία τον ανακυκλώνουν επαναφέροντάς τον στη μεμβράνη, είτε μεταφέροντας το NICD στον πυρήνα για μη-κανονική σηματοδότηση.

[9]

1.2 | Σύνθεση, μεταφορά στη μεμβράνη και ανακύκλωση του Notch

Η πρωτεΐνη Notch παράγεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου συνδέεται με την O-φουκοσυλοτρανσφεράση (O-Fut), η οποία την μεταφέρει στο σύστημα Golgi. Στο Golgi κόβεται από μια furin-like πρωτεάση σε δύο τμήματα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. Στη συνέχεια, γλυκοσυλιώνεται από την O-Fut, η οποία προσθέτει την 1η φουκόζη, και από άλλες γλυκοσυλοτρανσφεράσες (π.χ. την Fringe), και αποκτά την τελική του διαμόρφωση. Έχει βρεθεί ότι η γλυκοσυλίωση του υποδοχέα μεταβάλλει την ικανότητα ενεργοποίησης από τους προσδέτες. Ο γλυκοσυλιωμένος Notch μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη.

Ο χρόνος ημιζωής του υποδοχέα Notch είναι κατά μέσο όρο τρεις ώρες. Χωρίς να προηγηθεί σύνδεση, ο Notch ουβικουιτινώνεται από τις E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης της οικογένειας Itch, Nedd4 και Su(dx), οι οποίες συνδέονται στο ενδοκυτταρικό COOH-τελικό τμήμα του και ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική μεταφορά του στα πρωτεασώματα, όπου θα αποικοδομηθεί. Μια άλλη E3 λιγάση της ουβικουιτίνης, η Deltex, συνδέεται στις επαναλήψεις αγκυρίνης του ενδοκυτταρικού τμήματος



του Notch και το μονο-ουβικουιτίνωει. Η Deltex στη *Drosophila* ανταγωνίζεται την αρνητική επίδραση της Suppressor of Deltex, Su(dx), και έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του Notch σε ενδοκυτταρικά κυστίδια πλούσια σε συνταξίνη, τα οποία τον ανακυκλώνουν επαναφέροντάς τον στην πλασματική μεμβράνη είτε μεταφέροντάς τον στον πυρήνα (Εικόνα 3.3). Αυξημένη έκφραση της Deltex στη *Drosophila* οδηγεί στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης Notch απουσία προσδέτη (ligand independent activation). Πιθανόν η ακριβής ισορροπία μεταξύ των δραστηριοτήτων των διαφόρων E3-λιγασών υπαγορεύει το αποτέλεσμα για τον εντοπισμό και τη δραστηριότητα του Notch. Αυτές οι διαφορετικές ουβικουιτινώσεις θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάζουν το διάστημα που ο υποδοχέας βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, την προσβασιμότητά του σε προσδέτες ή την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με τη γ-σεκρετάση.

Ο Notch μπορεί όμως να ενδοκυτταρωθεί και χωρίς να προηγηθεί ουβικουιτινώση μέσα σε ενδοσώματα που εκφράζουν τις GTPάσες Rab. Αυτού του είδους η ενδοκυττάρωση είναι απαραίτητη για την επανεμφάνιση ενεργού Notch στη μεμβράνη (διαδικασία απαραίτητη και για τους προσδέτες).

Εικόνα 3.4

Ο υποδοχέας Notch και ο προσδέτης Delta είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη μία φορά και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των εξωκυτταρικών τους άκρων. Έχουν βρεθεί 2 ισομορφές προσδετών στη *Drosophila* (Delta, Serrate) και 5 στα θηλαστικά (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2). Οι προσδέτες έχουν ένα μεγάλο NH₂-τελικό εξωκυτταρικό άκρο, που αποτελείται από επαναλήψεις EGF-like (ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλλει), και μια καλά συντηρημένη περιοχή DSL. Επιπλέον, η Serrate και οι JAG1,2 περιέχουν μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (CRD, Cysteine Rich Domain). Στην εικόνα διακρίνονται, επίσης, οι 4 ισομορφές των υποδοχέων Notch των θηλαστικών (Notch1-4) και ο υποδοχέας Notch της *Drosophila*.

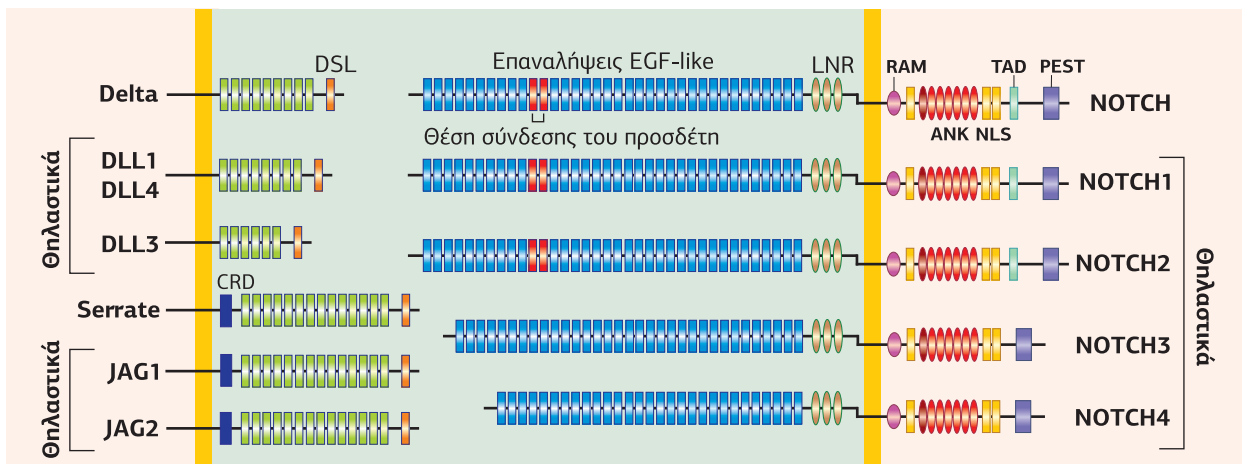
[18]

2. Περιγραφή του σηματοδοτικού μονοπατιού

Ένας σχετικά μικρός αριθμός πρωτεϊνών αποτελεί τον “πυρήνα” των μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του Notch: πρόκειται για τους προσδέτες, τους υποδοχείς Notch και τους μεταγραφικούς παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch στον πυρήνα.

Ως προσδέτες του υποδοχέα Notch έχουν βρεθεί στη *Drosophila* δύο πρωτεΐνες, η Delta και η Serrate, στο *Caenorhabditis* οι Lag-2 (Lin12 και GLP1), APX, ARG1, DSL1 και στα θηλαστικά οι Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4) και οι Jagged 1 και 2 (JAG1, JAG2). Γι’ αυτό και οι προσδέτες χαρακτηρίζονται ως **DSL Ligand** (Delta-Serrate-Lag). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαμεμβρανικές και διαπερνούν και αυτές μόνο μία φορά την κυτταρική μεμβράνη. Έχουν ένα μεγάλο NH₂-τελικό εξωκυτταρικό άκρο, το οποίο αποτελείται από επαναλήψεις EGF-like (ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλλει ανάλογα με τον προσδέτη), και μια καλά συντηρημένη περιοχή DSL, η οποία απαιτείται για την αλληλεπίδραση με τον Notch.

Μετά τη σύνδεση προσδέτη-Notch, το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch αποκόβεται από τη μεμβράνη και οδηγείται στον πυρήνα, όπου συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα **CSL** (CBF1 - Su(H) - Lag1), καθώς στα θηλαστικά ονομάζεται CBF1 (ή RBP-J_K), στη *Drosophila* Suppressor of Hairless [Su(H)] και στο *Caenorhabditis* Lag-1. Ο κύριος στόχος των μεταγραφικών αυτών παραγόντων είναι το σύμπλοκο 8 γονιδίων E(spl) (Enhancer of split), υπεύθυνων για την παραγωγή πρωτεϊνών HES. Οι πρωτεΐνες HES έχουν δομή helix-loop-helix και δρουν ως μεταγραφικοί



καταστολείς γονιδίων που ρυθμίζουν τη νευρογένεση.

Πίνακας 2.1

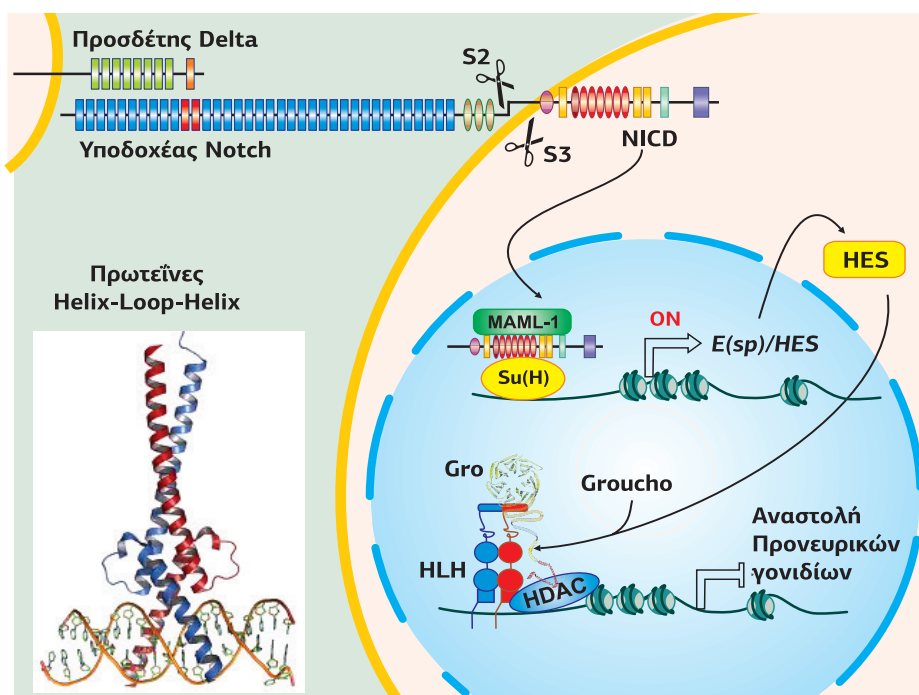
Οι πρωτεΐνες που αποτελούν τον “πυρήνα” των μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του Notch είναι οι προσδέτες DSL, οι υποδοχείς Notch και οι μεταγραφικοί παράγοντες CSL, με τους οποίους αλληλεπιδρά το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch στον πυρήνα.

	Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch		
	Ενεργοποίηση του Υποδοχέα DSL προσδέτες	Υποδοχέας Notch	Ενεργοποίηση του Μεταγραφικού παράγοντα CSL
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Lag-2, APX-1, ARG-1, DSL1	LIN-12, GLP-1	Lag-1
<i>Drosophila melanogaster</i>	Delta, Serrate	Notch	Su(H)
Θηλαστικά	DLL1, DLL3-4, Jagged 1,2	Notch 1-4	CBF1/RBPJκ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch στη *Drosophila*

Σε γενικές γραμμές το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch στη *Drosophila* ξεκινά από την αλληλεπίδραση του προσδέτη Delta/Serrate ενός κυττάρου με τον υποδοχέα Notch ενός γειτονικού κυττάρου. Ως αποτέλεσμα, η ενδοκυτταρική περιοχή του Notch (NICD) αποκόβεται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τον μεταγραφικό παράγοντα Su(H). Απουσία NICD, ο Su(H) βρίσκεται συνδεδεμένος στον εκκινητή των γονιδίων E(spl)/HES, μαζί με την πρωτεΐνη Hairless, τους συν-καταστολείς CtBP και Groucho (Gro), και τις αποακετυλάσες ιστονών (HDAC), εμποδίζοντας την ακετυλίωση των ιστονών και το ξεδίπλωμα της χρωματίνης, με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων E(spl)/HES. Η σύνδεση του NICD στον Su(H) απομακρύνει το σύμπλοκο καταστολής και επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών HES (Hairy και Enhancer of Split-1), πρωτεΐνες δομής Helix-Loop-Helix, οι οποίες με τη σειρά τους δρουν ως κατασταλτικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι προσελκύοντας και πάλι τον Groucho και τις HDACs αναστέλλουν τη μεταγραφή προ-νευρικών γονιδίων εμποδίζοντας τη νευρική μοίρας του αδιαφοροποίητου προ-νευρικού κυττάρου (Εικόνα 3.5).

Οι πρωτεΐνες **Groucho** είναι συν-καταστολείς (corepressors) που απαιτούνται για τη δράση πολλών μεταγραφικών καταστολέων. Ως συν-καταστολείς ορίζονται οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη κατασταλτική δραστηριότητα ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων, χωρίς όμως να έχουν την ικανότητα να συνδέονται απευθείας στο DNA. Οι πρωτεΐνες Groucho αποτελούνται από 7 καλά διατηρημένες περιοχές **WD40** (περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) στο COOH-άκρο, μια περιοχή τετραμερισμού πλούσια σε γλουταμίνη (**Q**) στο NH₂-άκρο, και μεταξύ αυτών μια περιοχή **GP** (πλούσια σε γλυκίνη και προλίνη), η οποία αλληλεπιδρά με τις HDACs, μια **CcN** που κατευθύνει την Groucho στον πυρήνα και μια περιοχή **SP** (Ser/Pro Rich).



Εικόνα 3.5
Σηματοδότηση του Notch στη *Drosophila*. Μετά την αλληλεπίδραση του Notch με τον προσδέτη ενός γειτονικού κυττάρου, η ενδοκυτταρική περιοχή του (NICD) αποκόπτεται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα Su(H). Η σύνδεση του NICD επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών HES, πρωτεΐνες basic-Helix-Loop-Helix (bHLH). Οι HES με τη σειρά τους αναστέλλουν τη μεταγραφή προ-νευρικών γονιδίων με τη βοήθεια του Groucho (Gro) και των HDACs. [14]

2.1 | Αλληλεπίδραση Notch-Προσδέτη

Η έναρξη των γεγονότων που οδηγούν στη μετάδοση μηνύματος μέσω των υποδοχέων Notch προϋποθέτει εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των υποδοχέων αυτών με μόρια προσδέτες γειτονικών κυττάρων (πρωτεΐνες Delta, Serrate ή Lag). Η αλληλεπίδραση Notch-προσδέτη γίνεται μεταξύ συγκεκριμένων EGF-like περιοχών του υποδοχέα Notch (κυρίως με την 11n και 12n EGF-like περιοχή) και της NH₂-τελικής περιοχής DSL του προσδέτη (**Εικόνα 3.6**).

Εικόνα 3.6

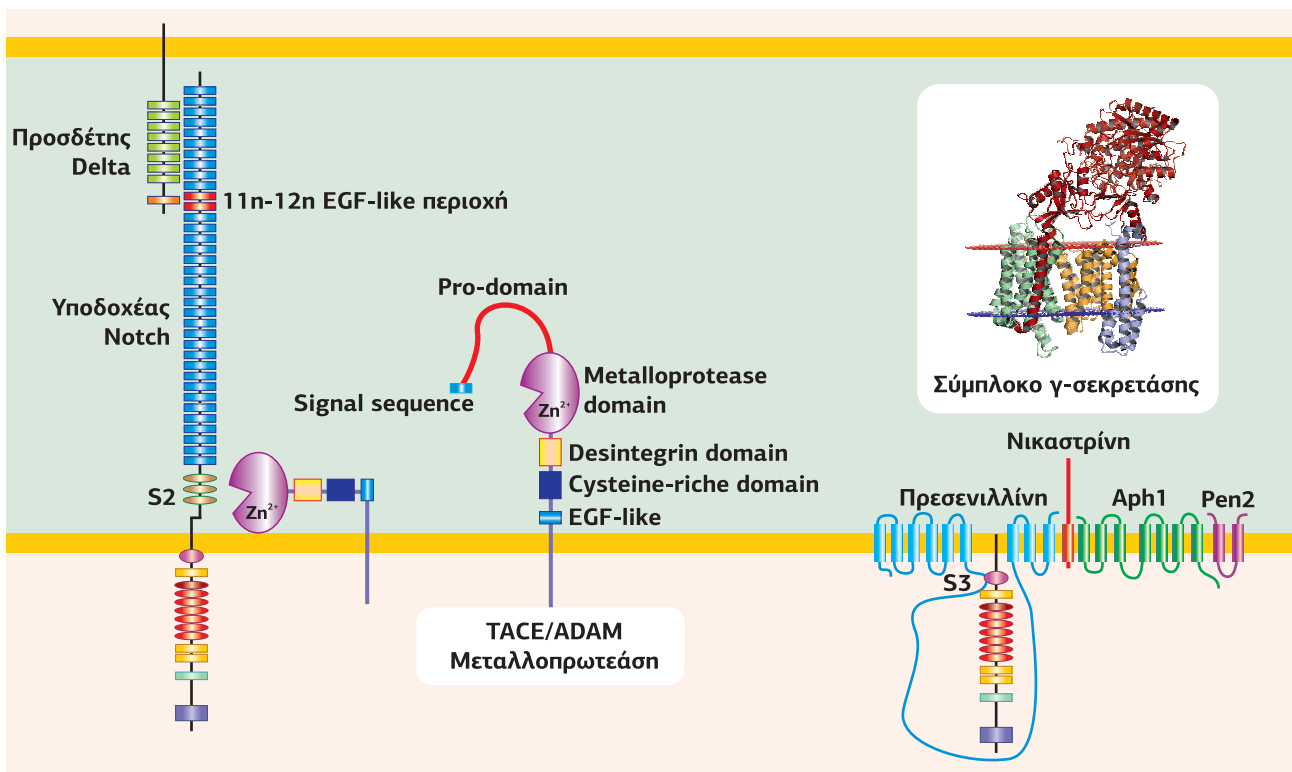
Η σύνδεση του προσδέτη Delta στον υποδοχέα Notch λαμβάνει χώρα μέσω της DSL περιοχής του Delta και της 11ης-12ης EGF-like περιοχής του Notch. Η σύνδεση οδηγεί στην αποκοπή του εξωκυτταρικού τμήματος του Notch από τη μεμβράνη με τη βοήθεια της ADAM/TACE μεταλλοπρωτεάσης. Στη συνέχεια, το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch αποκόβεται από τη μεμβράνη με τη βοήθεια της γ-σεκρετάσης. Στην εικόνα διακρίνεται η δομή της TACE, όπου η NH₂-τελική περιοχή "signal sequence" παίζει ρόλο στην αρχική αναδίπλωση της πρωτεάσης και στη διατήρηση της καταλυτικής δραστηριότητας κατά την ενδοκυτταρική μεταφορά της TACE. Η "signal sequence" απομακρύνεται πριν τη σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου. [34]

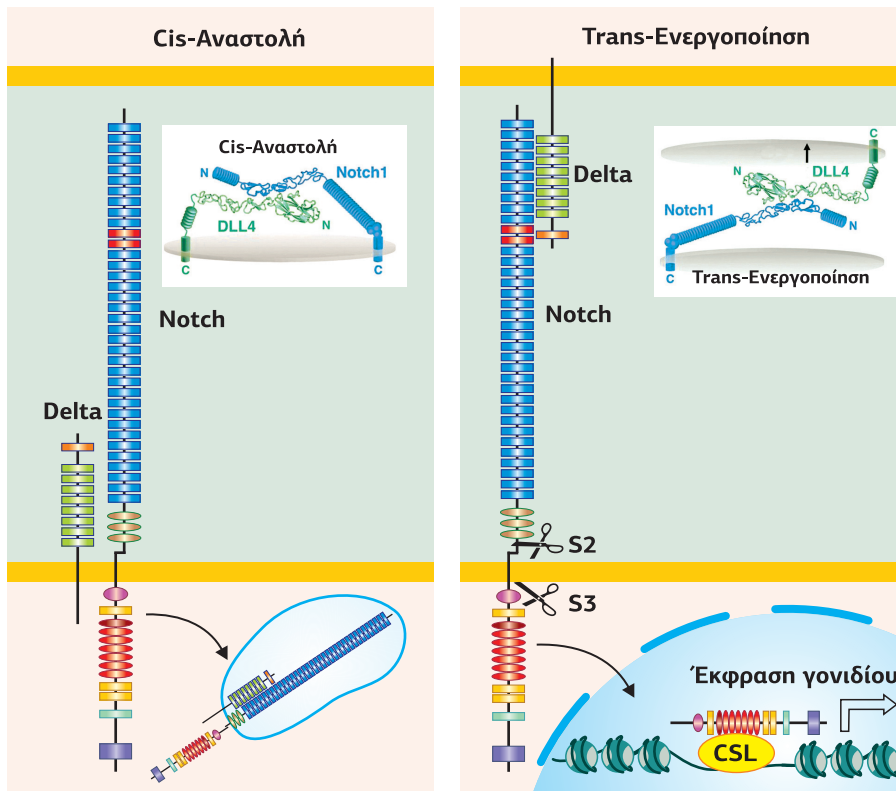
Όταν ο Notch συνδέεται με τους προσδέτες των γειτονικών κυττάρων ενεργοποιείται (trans-activation), ενώ όταν συνδέεται με προσδέτες που βρίσκονται στη μεμβράνη του ίδιου κυττάρου απενεργοποιείται/αναστέλλεται (cis-inhibition) (**Εικόνα 3.7**). Ο ρόλος της cis-αναστολής δεν είναι ακόμη γνωστός.

Ουβικουιτίνωση και δραστηριότητα του προσδέτη: Η ανακάλυψη ότι οι E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης Neuralized (Neur) και Mindbomb (Mib), οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα με τους προσδέτες του Notch προωθώντας την ενδοκυττάρωσή τους μέσω της πρωτεΐνης Epsin, είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των προσδετών, αρχικά θεωρήθηκε παράδοξο (**Εικόνα 3.8**). Η απουσία της Neur ή της Mib οδηγεί σε συσσώρευση του προσδέτη στην επιφάνεια, αλλά σε ανενεργή μορφή. Αρνητικές μεταλλάξεις της Neur στη *Drosophila* έχουν ως αποτέλεσμα νευρογενείς φαινότυπους. Πιθανές εξηγήσεις είναι ότι η ενδοκυττάρωση του προσδέτη:

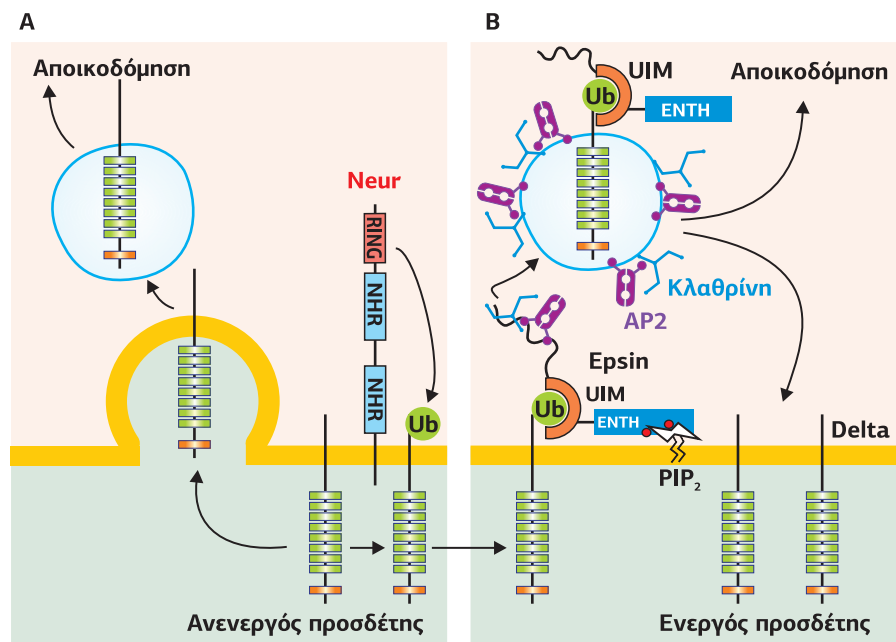
- προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της παρακείμενης μεμβρανικής περιοχής,
- προωθεί τη συσσώρευση του προσδέτη,
- επιτρέπει τη μεταφορά του προσδέτη σε ενδοκυτταρικό διαμέρισμα, το οποίο είτε είναι υπεύθυνο για την τροποποίηση του προσδέτη (π.χ. τη γλυκοσυλίωσή του) είτε τον επανατοποθετεί σε ειδικές θέσεις της μεμβράνης.

Η Neur και η Mib καθώς ουβικουιτίνωνουν διαφορετικές Lys της Delta μπορούν να έχουν διαφορετικά αποτελέσματα. Μπορούν, επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις να επάγουν την αποικοδόμηση του προσδέτη.



**Εικόνα 3.7**

Ο υποδοχέας Notch ενεργοποιείται από προσδέτες που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των γειτονικών κυττάρων (trans-activation), ενώ αναστέλλεται όταν συνδέεται με προσδέτες που εκφράζονται ταυτόχρονα από το ίδιο κύτταρο (cis-inhibition). [40]

**Εικόνα 3.8**

Η ενεργοποίηση του προσδέτη προϋποθέτει ουβικουτίνωση.

A. Οι E3 λιγάσες της ουβικουτίνης Neuralized (Neur) και Mindbomb (Mib) αλληλεπιδρούν άμεσα με τους προσδέτες του Notch. Εάν δεν προηγηθεί ουβικουτίνωση από τις Neur ή Mib, οι προσδέτες παραμένουν ανενεργοί. B. Η ουβικουτίνωση των προσδετών από τις Neur και Mib απαιτείται για την Epsin-μεσολαβούμενη ενδοκυττάρωση τους σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και AP2. [9]

2.2 | Ενεργοποίηση του Notch

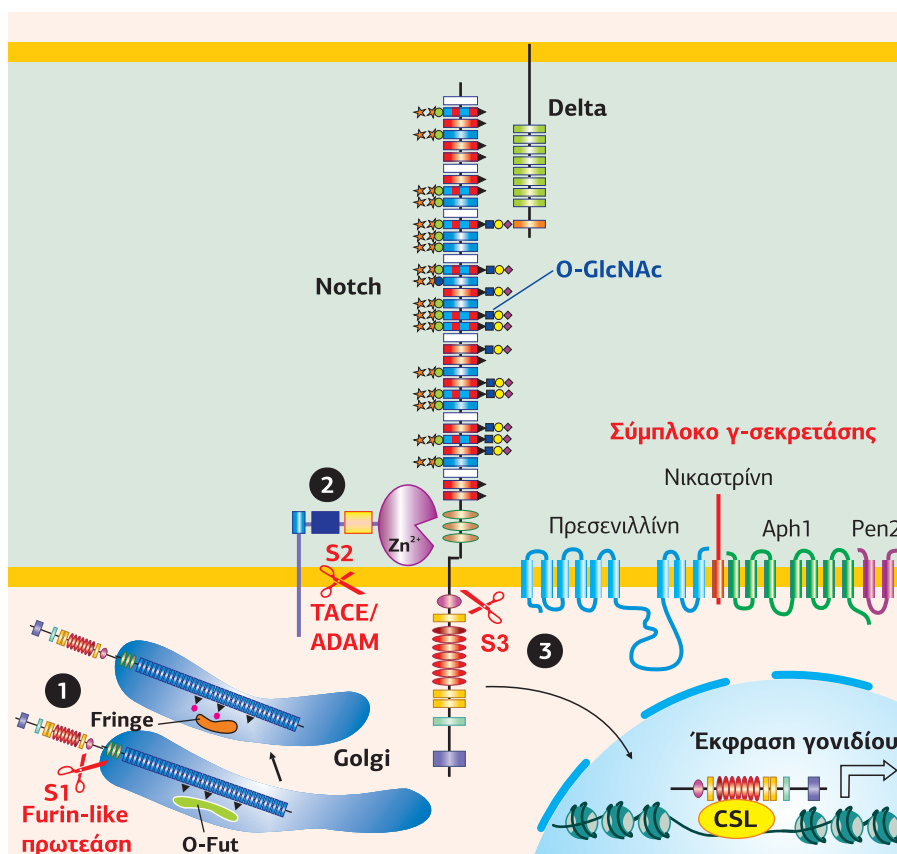
Είδαμε ότι οι υποδοχείς Notch είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αποτελούνται από μια ενδοκυτταρική, μια εξωκυτταρική και μια διαμεμβρανική περιοχή. Το εξωκυτταρικό μέρος παίζει τον ρόλο της περιοχής σύνδεσης του προσδέτη DSL. Όταν ο προσδέτης συνδεθεί με τον υποδοχέα Notch, το εξωκυτταρικό τμήμα του

Οι **epsins** είναι μια οικογένεια καλά συντηρημένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία εγκοιλώσεων της μεμβράνης, π.χ. κατά την ενδοκύτωση. Περιέχουν μια χαρακτηριστική περιοχή 150 αμινοξέων στο NH₂-άκρο, την ENTH, η οποία συνδέεται σε λιπίδια της μεμβράνης και βοηθάει στη δημιουργία κυστιδίων πλούσιων σε κλαθρίνη. Στο COOH-τελικό άκρο της ENTH υπάρχει το μοτίβο UIM (Ubiquitin Interacting Motif) που αλληλεπιδρά με ουβικουτινωμένες πρωτεΐνες.

Εικόνα 3.9

Τα τρία πρωτεολυτικά στάδια που συμβαίνουν στον υποδοχέα Notch. 1. Ο Notch αρχικά, κατά την ωρίμανσή του στο σύστημα Golgi, κόβεται σε δύο κομμάτια, τα οποία στη συνέχεια συνδέονται με ειδικό δεσμό και μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη (S1 πρωτεόλυση από τη Furin-like πρωτεάση). 2. Μετά τη σύνδεση του προσδέτη το εξωκυτταρικό τμήμα του Notch αποκόβεται από TACE μεταλλοπρωτεάσες (S2 πρωτεόλυση από μεταλλοπρωτεάσες). 3. Η S3 πρωτεόλυση συμβαίνει αμέσως μετά, από ένα σύμπλοκο πρωτεασών, τη γ-σεκρετάση, η οποία περιλαμβάνει την πρεσενιλίνη, την Pen2, την Aph1 και τη νικαστρίνη. Η S3 πρωτεόλυση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού κομματιού του Notch (NICD) στο κυτταρόπλασμα και τη μεταφορά του στον πυρήνα.

[43]



Notch αποκόβεται και παραμένοντας συνδεδεμένο με τον προσδέτη ενδοκυτταρώνεται στο κύτταρο, όπου την επιφάνεια βρίσκεται ο προσδέτης. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια τρίτη πρωτεόλυση και απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch στο κυτταρόπλασμα, όπου θα παίξει τον ρόλο ενός μηνύματος που θα μεταφερθεί στον πυρήνα και θα ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

Στον Notch συμβαίνει πρωτεόλυση σε τρία σημεία, τα S1, S2, S3 (Εικόνα 3.9).

Η S1 πρωτεόλυση συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της πρωτεΐνης στο σύστημα Golgi από μια furin-like πρωτεάση. Τα δύο τμήματα που προκύπτουν ενώνονται με έναν δεσμό, για τη δημιουργία του οποίου απαιτείται ασβέστιο. Υπό αυτή τη μορφή ο Notch μεταφέρεται στη μεμβράνη.

Η S2 πρωτεόλυση συμβαίνει μετά τη σύνδεση του προσδέτη. Οι μεταλλοπρωτεάσες, ADAM-10 (A Disintegrin And Metalloproteinase) ή Kuzbanian και ADAM-17 ή TACE (TNF-A-Converting Enzyme) διασπούν τον δεσμό που δημιουργήθηκε μετά την S1 πρωτεόλυση, απελευθερώνοντας το εξωκυτταρικό τμήμα του Notch, το οποίο και απομακρύνεται μαζί με τον προσδέτη. Το μέρος του Notch που απέμεινε στη μεμβράνη ονομάζεται **NEXT**.

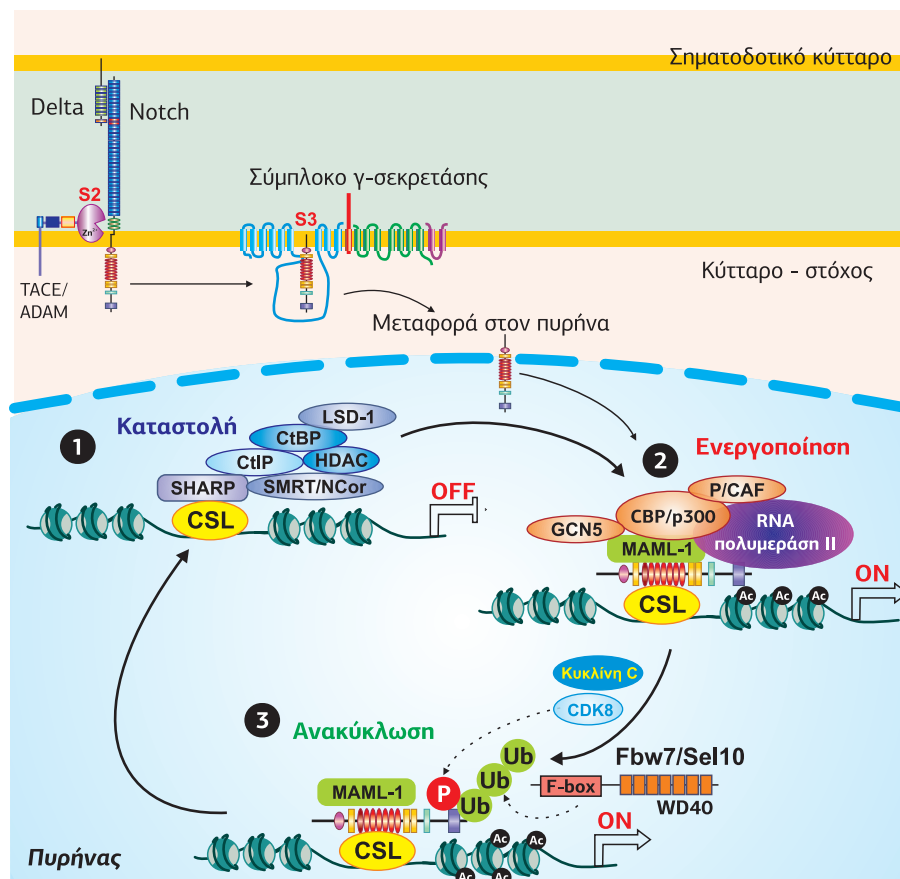
Η S3 πρωτεόλυση πραγματοποιείται από ένα πολυμερές σύμπλοκο πρωτεασών, τη γ-σεκρετάση, η οποία αποτελείται από τέσσερις ανεξάρτητες πρωτεΐνες, την πρεσενιλίνη 1-2 (η καταλυτική υπομονάδα), την Pen2 (Presenilin enhancer 2), την Aph1 (Anterior pharynx-defective-1) και τη νικαστρίνη. Η S3 πρωτεόλυση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού κομματιού του Notch, του **NICD** (Notch Intracellular Domain), στο κυτταρόπλασμα. Το NICD οδηγείται στον πυρήνα, στο κατάλληλο σημείο του πυρηνικού DNA από μια αλληλουχία σιγιάλο, την NLS (Nuclear Localization Signal). Η S3 πρωτεόλυση είναι καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της σηματοδότησης του Notch και γι' αυτό η S3 περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένη.

2.3

Μεταφορά του NICD στον πυρήνα και ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων

Από τη στιγμή που απελευθερώνεται το NICD από τη μεμβράνη, οδηγείται χάρη στην αλληλουχία NLS (Nuclear Localization Sequence) στον πυρήνα, στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου. Τα γονίδια-στόχοι του Notch είναι τα γονίδια **HES/E(spl)** (**H**airy/**E**nhancer of **S**plit), τα οποία είναι καλά συντηρημένα σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Χαρακτηρίζονται ως καταστολείς της νευρικής μοίρας προνευρικών κυττάρων, καθώς η απουσία τους οδηγεί τα κύτταρα σε νευρογενή φαινότυπο. Όπως είδαμε, οι πρωτεΐνες HES είναι μεταγραφικοί παράγοντες με δομή helix-loop-helix που καταστέλλουν τη μεταγραφή.

Το NICD δεν μπορεί να συνδεθεί απευθείας στο DNA, στον εκκινητή των γονιδίων HES, αλλά συνδέεται στη συνδεδεμένη με το DNA πρωτεΐνη **CSL**, η οποία συναντάται με διαφορετικά ονόματα ανάλογα με τον οργανισμό: **CBF1** ή **RBP-J_κ** (Recombination signal sequence-Binding Protein J_κ) στα θηλαστικά, **Su(H)** στη *Drosophila* και **Lag1** στο *Caenorhabditis elegans*. Αρχικά η CSL θεωρήθηκε ως ένας μεταγραφικός παράγοντας που δρα ο ίδιος ως καταστολέας, αλλά στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη που έχει συνδεδεμένο ένα στοιχείο καταστολής 10bp. Η CSL, απουσία του NICD, στρατολογεί συν-καταστολείς, η σύνθεση των οποίων ποικίλλει ανάλογα με το είδος και τον κυτταρικό τύπο. Το σύμπλοκο συν-καταστολέων στα θηλαστικά περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες **SMRT** (Silencing Mediator for Retinoic acid), **SHARP** (SMRT and HDAC Associated Repressor Protein), **CtBP** (C-terminal Binding Protein) και **CtIP** (CtBP Interacting Protein). Στη *Drosophila* η CSL ονομάζεται Su(H) (Suppressor of Hairless) και στρατολογεί ως συν-καταστολείς την CtBP και την Groucho (Gro). Οι συν-καταστολείς στρα-



Εικόνα 3.10

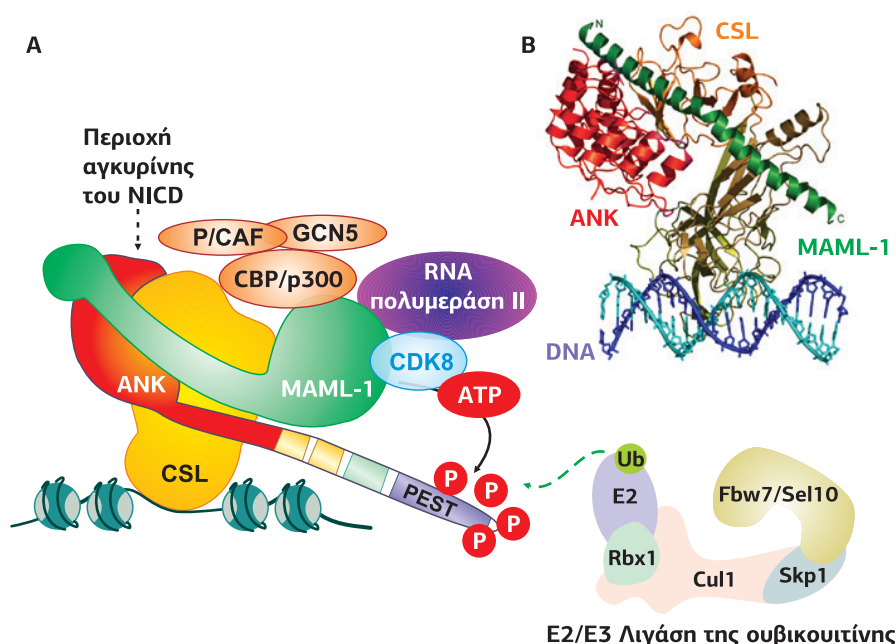
Ο ρόλος του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch στην έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου. 1. Απουσία NICD, τα γονίδια-στόχοι του Notch βρίσκονται σε καταστολή από ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που περιλαμβάνει την DNA-συνδεδεμένη πρωτεΐνη CSL, τους μεταγραφικούς συν-καταστολείς SMRT, SHARP, CtBP και CtIP, καθώς και αποακετυλάσες ιστονών (HDACs). 2. Το NICD συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα CSL και στρατολογεί τον ενεργοποιητή της μεταγραφής MAML-1 και ακετυλάσες των ιστονών P/CAF, p300/CBP και GCN5, οι οποίες ακετυλιώνουν τις ιστόνες για να ανοίξει η χρωματίνη και να ξεκινήσει η μεταγραφή. 3. Το τέλος της μεταγραφής σηματοδοτεί η φωσφορύλωση του NICD στην περιοχή PEST από την κυκλινω-εξαρτώμενη κινάση CDK8. Η φωσφορύλωση της περιοχής PEST προσελκύει το σύμπλοκο της E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης Fbw7/Sel10. Η ουβικουιτίνωση του NICD τον οδηγεί στα πρωτεασώματα για αποικοδόμηση. [7]

Εικόνα 3.11

Σύνδεση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch στον εκκινητή του γονιδίου-στόχου, μέσω της πρωτεΐνης CSL.

A. Το NICD μέσω της περιοχής αγκυρίνης (ANK) συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα CSL, ο οποίος βρίσκεται ήδη συνδεδεμένος στο DNA. Στη συνέχεια στρατολογείται και ο ενεργοποιητής της μεταγραφής MAML. Η σύνδεση του MAML στο σύμπλοκο στρατολογεί τις ακετυλάσες p300/GCN5 και την πολυμεράση II και αρχίζει η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του Notch. Μετά το τέλος του σήματος προσελκύεται και η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση CDK8, η οποία φωσφορυλιώνει την περιοχή PEST του NICD. Ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης ο NICD ουβικουτινώνεται από την E3 λιγάση της ουβικουτίνης Fbw7/Sel10 και μεταφέρεται στα πρωτεασώματα για αποικοδόμηση.

B. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CSL/MAML-1/NICD (περιοχή αγκυρίνης). [13]



τολογούν αποακετυλάσες ιστονών τύπου I ή II (HDACs, Histone Deacetylases), οι οποίες εμποδίζουν την ακετυλίωση των ιστονών και το ξεδίπλωμα της χρωματίνης. Το προλυπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο καταστολής λέγεται **Co-Repressor Complex** και εμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής (**Εικόνα 3.10**).

Όταν το NICD πλησιάσει το γονίδιο-στόχο, ανταγωνίζεται με τη SMRT για την πρόσδεση στο CSL. Η σύνδεση NICD-CSL γίνεται μέσω της περιοχής RAM και των αλληλουχιών αγκυρίνης του NICD. Μόλις πραγματοποιηθεί αυτή η σύνδεση, το σύμπλοκο συν-καταστολέων, συμπεριλαμβανομένων και των HDACs, εκτοπίζεται και αντικαθίσταται από τον μεταγραφικό παράγοντα **Mastermind-like** (MAML), μια πλούσια σε γλουταμίνη πρωτεΐνη που παίζει τον ρόλο ενεργοποιητή της μεταγραφής (**Εικόνα 3.11**). Το τριμερές σύμπλοκο CSL-NICD-MAML στρατολογεί τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών HATs (P/CAF, CBP/p300, GCN5), οι οποίες ακετυλιώνουν τις ιστόνες, ανοίγοντας τη χρωματίνη σε εκείνη την περιοχή, και την RNA πολυμεράση II για να ξεκινήσει η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Πιθανολογείται ότι μια άλλη λειτουργία των HATs είναι η ακετυλίωση της SMRT, που οδηγεί στην αποσύνδεσή της από την CSL και έτσι ευνοείται η σύνδεση του NICD. Μετά την ολοκλήρωση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων (HES), η MAML στρατολογεί την κυκλίνη C και την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 8 (Cyclin C/CDK8), η οποία φωσφορυλιώνει το NICD στην περιοχή PEST. Ειδικά η φωσφορυλίωση στην περιοχή PEST του NICD προσελκύει την E3 λιγάση της ουβικουτίνης Fbw7/Sel10, η οποία τον ουβικουτινώνει. Ο ουβικουτινωμένος NICD οδηγείται για αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα (**Εικόνα 3.10, 3.11**).

3. Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω Notch

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch ρυθμίζεται ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά. Ο Notch είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία διαπερνά μόνο μία φορά την κυτταρική μεμβράνη. Έχει, λοιπόν, μία ενδοκυτταρική, μία εξωκυτταρική και μία διαμεμβρανική περιοχή. Η ρύθμιση της σηματοδότησης γίνεται με ουβικουτινίωση του ενδοκυτταρικού τμήματος (NICD), εμποδίζοντας τη μεταφορά του στον πυρήνα, και γλυκοσυλίωση του εξωκυτταρικού, έτσι ώστε σε συγκεκριμένο χώρο και χρόνο, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, να αποκρίνεται διαφορετικά στους προσδέτες οδηγώντας σε συγκεκριμένα αποτελέσματα.

3.1 | Ενδοκυτταρική ρύθμιση: Ουβικουιτίνωση

Έχουν βρεθεί πρωτεΐνες με δράση E3 λιγάσης που είτε αλληλεπιδρούν με το NICD (n Fbw7/Sel10 και n Suppressor of deltex/Itch) είτε με τους προσδέτες του Notch (n Neur και n Mind bomb) είτε με ρυθμιστικές πρωτεΐνες του Notch (n LNX), ουβικουιτίνωντας και οδηγώντας τον στόχο τους στα πρωτεασώματα για πρωτεόλυση. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν συγκεκριμένες περιοχές που προσδίδουν την ιδιότητα αναγνώρισης-σύνδεσης του μορίου-στόχου, καθώς και αλληλουχίες που τους προσδίδουν την ιδιότητα της E3 λιγάσης (περιοχές HECT, F-box και RING), οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετική θέση σε κάθε ένζυμο (**Εικόνα 3.12A**). Για παράδειγμα, η Itch έχει την αλληλουχία που της προσδίδει την ιδιότητα E3 λιγάσης στα τελευταία COOH-τελικά αμινοξέα της, ενώ η Sel10 στα πρώτα.

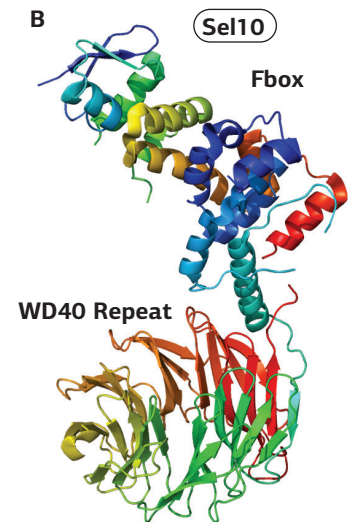
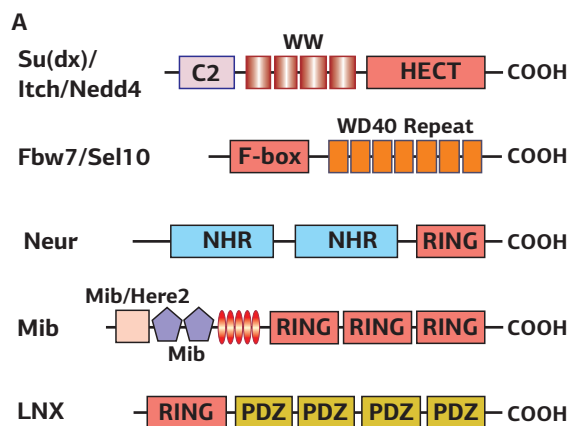
Ο ρόλος που παίζουν οι E3 λιγάσες μπορεί να είναι ο ελεγχόμενος τερματισμός του μηνύματος του Notch στον πυρήνα (π.χ. η Fbw7/Sel10), η μείωση του αριθμού των υποδοχέων Notch της μεμβράνης χωρίς να προηγηθεί σύνδεση του προσδέτη (π.χ. η Suppressor of deltex), η θετική ρύθμιση της σηματοδότησης του Notch ουβικουιτίνωντας αρνητικούς ρυθμιστές του Notch (π.χ. η LNX ουβικουιτίνώνει τον αρνητικό ρυθμιστή Numb) ή τους προσδέτες του Notch, οι οποίοι με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούνται (π.χ. Neur και η Mib).

1. Fbw7/Sel10: οδηγούν στον τερματισμό του μηνύματος

Η Fbw7 (F-box WD repeat containing protein 7) στα θηλαστικά και η Sel10 (Suppressor and/or enhancer of Lin-12) στο *Caenorhabditis elegans* ανακαλύφθηκαν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης του Notch. Είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν τμήμα του συμπλόκου της λιγάσης ουβικουιτίνης SCF (Skr1-Cullin 1-F-box). Ο πυρήνας του συμπλόκου συνίσταται από τις πρωτεΐνες Skp1 (πρωτεΐνη προσαρμογής), Rbx1 (πρωτεΐνη που συνδέεται με το ένζυμο E2) και Cullin 1 (η πρωτεΐνη σκαλωσιάς) (βλ. **Εικόνα 1.41**). Οι Fbw7/Sel10 λιγάσες περιέχουν μία περιοχή F-box, η οποία αποτελεί την καταλυτική περιοχή του ενζύμου, μέσω της οποίας συνδέονται με την Skp1, και μία περιοχή με επτά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες WD40, με δομή β-προπέλας, μέσω της οποίας αλληλεπιδρούν με την ήδη φωσφορυλιωμένη περιοχή PEST του NICD, μέσα στον πυρήνα (**Εικόνα 3.12B**). Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ουβικουιτίνωση του NICD και τον τερματισμό της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του Notch.

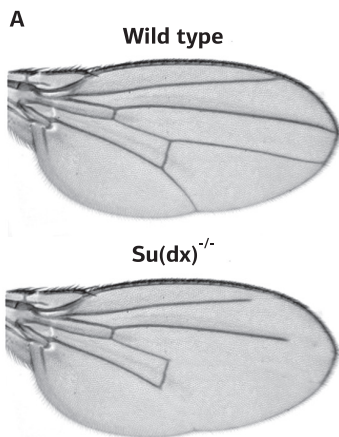
2. Suppressor of deltex και Itch: ρυθμίζουν τη συγκέντρωση του Notch στη μεμβράνη που μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον προσδέτη

Η Suppressor of deltex είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται μέσω των WW περιοχών της με το NICD, το πολυ-ουβικουιτίνώνει και το οδηγεί σε πρωτεόλυση, χωρίς να προηγηθεί σύνδεση του προσδέτη (**Εικόνα 3.13B**). Είναι λοιπόν ένας αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του Notch, καθώς μειώνει τον αριθμό των υποδοχέων Notch που βρίσκονται στη μεμβράνη. Η Suppressor of deltex ανακαλύφθηκε στη *Drosophila melanogaster*, καθώς η αρνητική της μετάλλαξη οδηγεί στην ανάπτυξη κενών στα νεύρα των φτερών (**Εικόνα 3.13A**), έναν φαινό-



Εικόνα 3.12

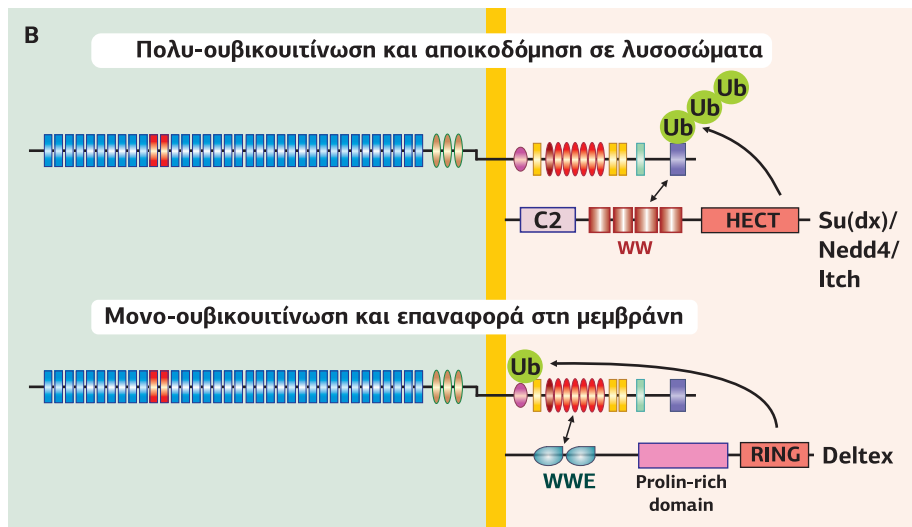
A. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών των E3 λιγάσεων που έχουν σχέση με τη ρύθμιση της σηματοδότησης του Notch. Οι περιοχές C2, WW, WD40, NHR (Neur Homology Repeats), PDZ είναι οι περιοχές που προσδίδουν την ιδιότητα αναγνώρισης-σύνδεσης του μορίου-στόχου και με κόκκινο οι περιοχές που προσδίδουν την ιδιότητα E3 λιγάσης (HECT, RING, F-box). [28]
B. Κρυσταλλική δομή της E3 λιγάσης Sel10, όπου διακρίνεται η περιοχή F-box και οι WD40 περιοχές.



Εικόνα 3.13

Ο ρόλος της *Suppressor of deltex*. Α. Φωτογραφία φτερού *Drosophila*. Τα νεύρα στο φτερό της *Drosophila* αναπτύσσονται κανονικά (wild type), ενώ υπάρχουν κενά στα νεύρα λόγω της αρνητικής μετάλλαξης της *Su(dx)*, η οποία οδηγεί σε αυξημένη Notch σηματοδότηση (μείωση των νευρικών κυττάρων). [5]

Β. Η *Su(dx)* συνδέεται μέσω των WW περιοχών της με το NICD και μέσω της καταλυτικής της περιοχής HECT το πολυ-ουβικουιτίνώνει και το οδηγεί σε πρωτεόλυση, χωρίς να προηγηθεί σύνδεση του προσδέτη. Αντιθέτως, η E3 λιγάση Deltex αλληλεπιδρά μέσω της WWE με το NICD, μονο-ουβικουιτίνώνει τον Notch, ο οποίος, στη συνέχεια, επανέρχεται στην πλασματική μεμβράνη μέσω ενδοσωμάτων. [29]



τυπο όμοιο με εκείνο της θετικής μετάλλαξης της πρωτεΐνης Deltex. Η Deltex είναι μια μεμβρανική E3 λιγάση, η οποία συνδέεται μέσω της WWE περιοχής, πλούσια σε W (Trp) και E (Glu), και μονο-ουβικουιτίνώνει τον Notch σε μια καλά συντηρημένη Lys κοντά στη μεμβράνη, χωρίς να προηγηθεί σύνδεση του προσδέτη. Ως αποτέλεσμα, ο Notch επανέρχεται σε ενεργή κατάσταση στη μεμβράνη μέσω ενδοσωμάτων.

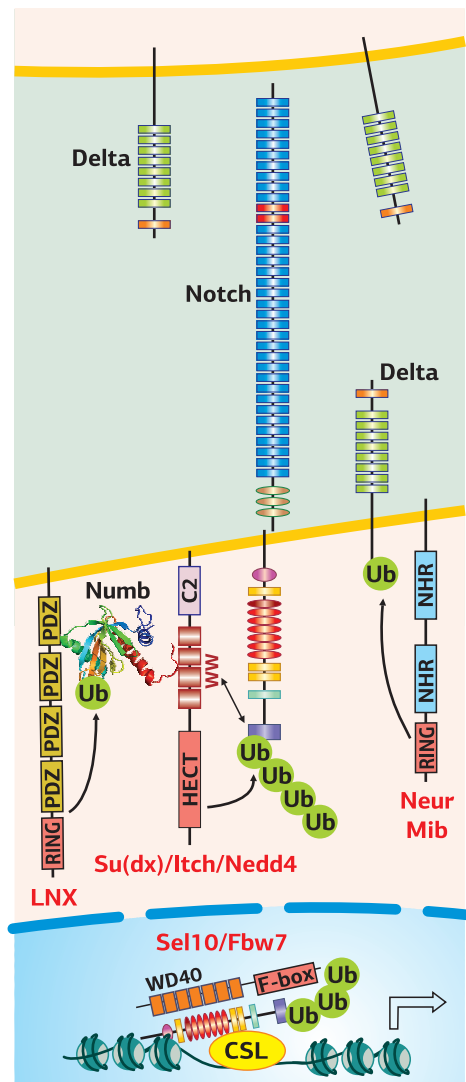
Η ομόλογη πρωτεΐνη της *Suppressor of deltex* στον άνθρωπο είναι η Nedd4 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4), ενώ στα ποντίκια είναι η Itch. Η αρνητική μετάλλαξη της Itch προκαλεί στα ποντίκια συνεχή φαγούρα στο δέρμα και ανωμαλίες στο ανοσοποιητικό τους σύστημα.

3. LNX: μέσω ουβικουιτίνωσης της Numb διευκολύνει τη σηματοδότηση Notch

Η LNX (Ligand for Numb protein X1) είναι μια E3 λιγάση της ουβικουιτίνωσης που ουβικουιτίνώνει την πρωτεΐνη Numb, οδηγώντας την στα πρωτεασώματα (Εικόνα 3.14). Η Numb είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του Notch. Συνδέεται μέσω της PTB (Phosphotyrosine

Εικόνα 3.14

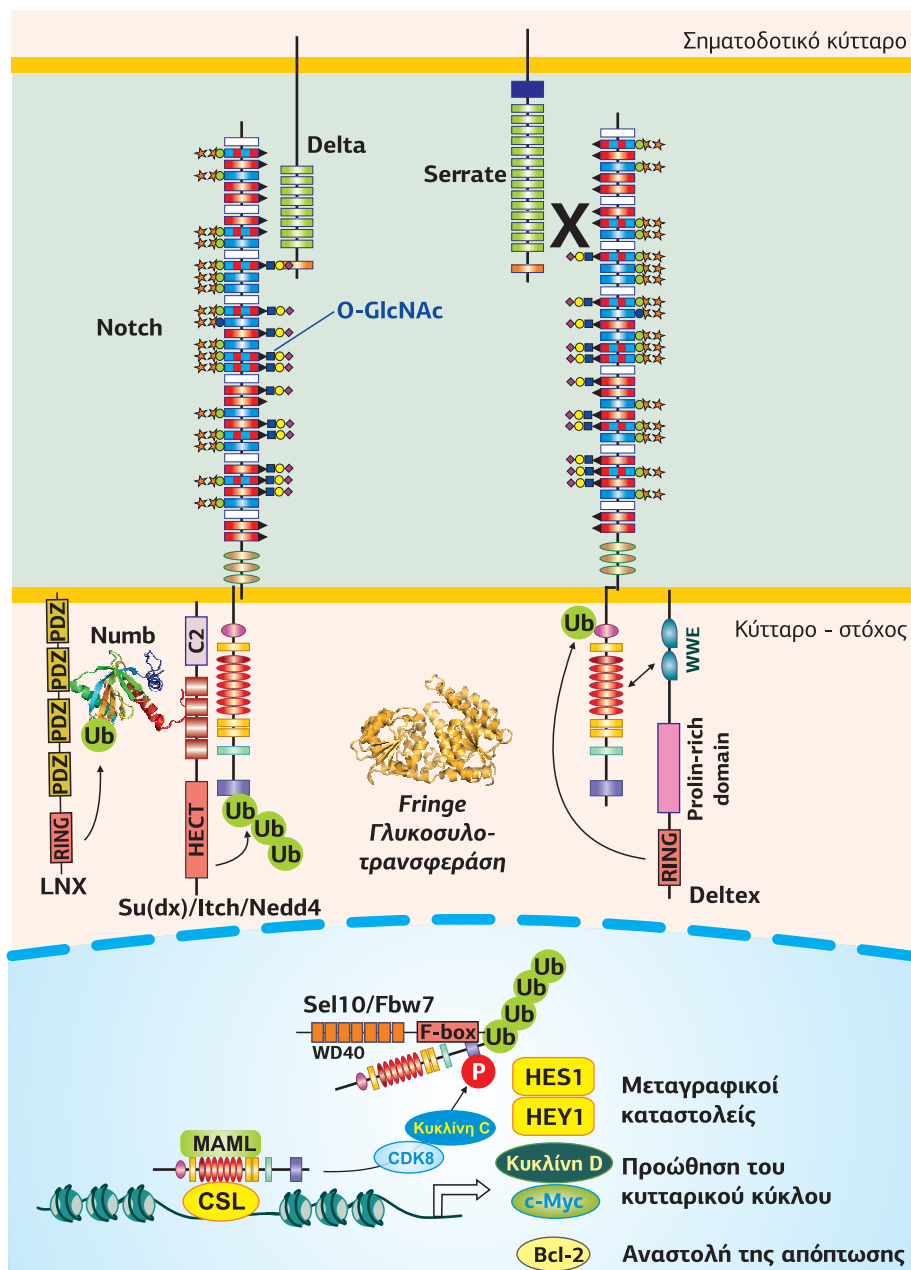
Η θέση των E3 λιγασών και ο τρόπος δράσης τους στη σηματοδότηση του Notch. Η *Sel10/Fbw7* βρίσκεται μέσα στον πυρήνα και ουβικουιτίνώνει το NICD, τερματίζοντας τη μεταγραφή. Η *Su(dx)/Itch/Nedd4* βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και ουβικουιτίνώνει το NICD, πριν από τη σύνδεση του προσδέτη. Η *LNX* ουβικουιτίνώνει τη *Numb*, η οποία προσελκύει στον Notch την E3 λιγάση Itch. Η *LNX* οδηγώντας στην αποικοδόμηση έναν αρνητικό ρυθμιστή του Notch αυξάνει τη σηματοδότησή του. Η *Neur* και η *Mib* βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τον Notch, αλλά ουβικουιτίνωνουν τους προσδέτες του Notch, οδηγώντας τους σε ανακύκλωση και ενεργοποίηση. [28]



Binding domain) περιοχής της σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες της E3 λιγάσης της ουβικουτίνης Su(dx)/Itch/Nedd4, την οποία προσελκύει στον Notch. Η Numb και η Su(dx)/Itch/Nedd4 δρουν σε συνεργασία για την αποικοδόμηση είτε ολόκληρου του Notch, πριν από την ενεργοποίησή του από κάποιον προσδέτη, είτε μόνο του NICD, μετά την αποκοπή του λόγω ενεργοποίησης του Notch, γεγονός που εμποδίζει τη μεταφορά του στον πυρήνα και ως εκ τούτου αναστέλλει τη σηματοδότηση του Notch. Συνεπώς, η παρουσία της LNX στο κύτταρο αυξάνει τη σηματοδότηση του Notch, ελαττώνοντας τα επίπεδα της Numb.

4. Neuralized: απαραίτητη για την ενεργοποίηση των προσδετών

Η Neur είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και αντίθετα από τις προηγούμενες πρωτεΐνες, δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το NICD ή με αρνητικούς ρυθμιστές του, αλλά ουβικουτινώνει τους προσδέτες του Notch, καθιστώντας τους με αυτόν τον τρόπο ενεργούς (Εικόνα 3.8, 3.14). Είναι, λοιπόν, απαραίτητη για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του Notch. Η Neur έχει δύο αλληλουχίες



Εικόνα 3.15
Ρύθμιση της σηματοδότησης του Notch μέσω ουβικουτινίωσης και γλυκοσυλίσωσης. Ένας αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού είναι η πρωτεΐνη **Numb**, η οποία προσελκύοντας την E3 λιγάση της ουβικουτίνης Itch διευκολύνει την ουβικουτινίωση και αποικοδόμηση του Notch, πριν ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη (ελέγχοντας έτσι τον χρόνο ημιζωής του Notch). Η E3 λιγάση **LNX1** έχει ως υπόστρωμα την πρωτεΐνη Numb (αρνητικό ρυθμιστή), την οποία μέσω ουβικουτινίωσης οδηγεί στα πρωτεασώματα για αποικοδόμηση, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο θετικά τη σηματοδότηση του Notch. Μια άλλη E3 λιγάση, η **Sel10**, ουβικουτινώνει το NICD μετά την είσοδό του στον πυρήνα, τερματίζοντας τη σηματοδότηση. Η E3 λιγάση **Deltex** (DTX1) μονο-ουβικουτινώνει το NICD, το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα, μέσω ενδοσωμάτων. Η γλυκοσυλίωση της εξωκυτταρικής περιοχής του Notch από την **Fringe** ευνοεί τη σύνδεση συγκεκριμένων προσδετών, όπως η Delta, ενώ αναστέλλει τη σύνδεση άλλων, όπως η Serrate. [38]

Εικόνα 3.16**Θέσεις γλυκοσυλίσωσης στο εξωκυτταρικό τμήμα του Notch1, στις αλληλουχίες EGF-like.**

Α. Διακρίνεται μια αλληλουχία EGF-like, η οποία αποτελείται από 40 αμινοξέα και περιέχει 6 καλά συντηρημένες κυστεΐνες, οι οποίες δημιουργούν μεταξύ τους τρεις δεσμούς θείου. Επίσης, περιέχει δύο Ser/Thr θέσεις O-γλυκοσυλίσωσης (μπλε) και μία Ser/Thr θέση O-φουκοσυλίσωσης (κόκκινο). Μετά την προσθήκη της 1ης O-φουκώζης ή O-γλυκώζης η αλυσίδα επιμηκύνεται από διαφορετικές γλυκοσυλοτρανσφεράσες που συμβολίζονται με βέλη. Π.χ. XXYLT (Xyloside Xylosyltransferase), GXYLT (Glucosyl Xylosyltransferase), Rumi (protein O-Glc-transferase), POFUT (Protein O-fucosyltransferase), Fringe, $\beta 4\text{GalT}$ ($\beta 1,4\text{-Gal transferase}$) και SiaT ($\alpha 2,3\text{-Sialyltransferase}$).

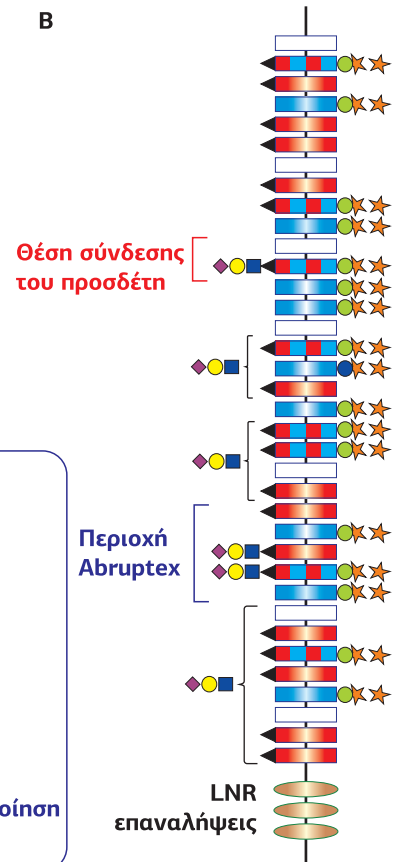
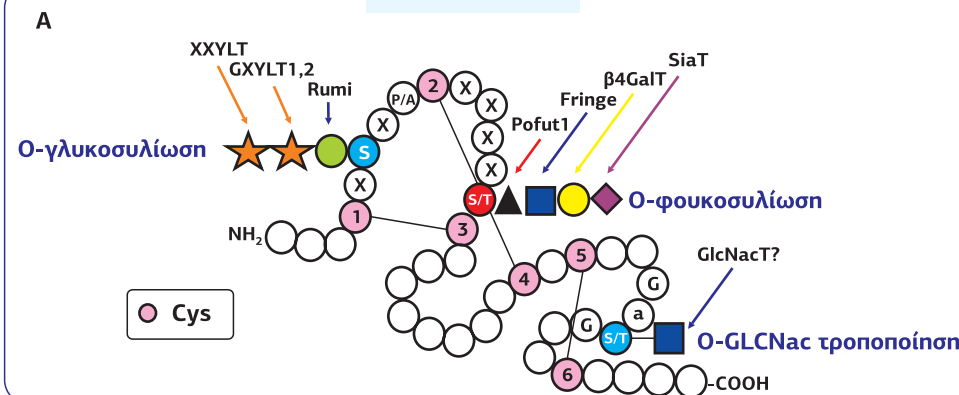
Β. Το εξωκυτταρικό τμήμα του Notch1 αποτελείται από 36 αλληλουχίες EGF και 3 επαναλήψεις LNR. Στις αλληλουχίες EGF-like αφού πρώτα προστεθεί μια O-φουκώζη (κόκκινο) ή μια O-γλυκώζη (μπλε), η αλυσίδα μπορεί να επιμηκυνθεί με γλυκώζη (πράσινοι κύκλοι), ξυλόζη (πορτοκαλί αστέρι), φουκώζη (μαύρο τρίγωνο), GlcNAc (μπλε τετράγωνο), γαλακτόζη (κίτρινος κύκλος) και σιαλικό οξύ (μωβ ρόμβος). Η περιοχή Abruptex χαρακτηρίζεται από μια σειρά μεταλλάξεων στις EGF 24-29 που δημιουργούν έναν ιδιόσυστατα υπερνεργό υποδοχέα. [37]

3.2**Εξωκυτταρική ρύθμιση: Γλυκοσυλίσωση**

Η εξωκυτταρική ρύθμιση της σηματοδότησης του Notch γίνεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της με γλυκοσυλίσωση του υποδοχέα. Το εξωκυτταρικό τμήμα του Notch αποτελείται από επαναλήψεις EGF-like, ο αριθμός των οποίων ποικίλλει στους διάφορους υπότυπους Notch (από 29 έως 36). Η κάθε αλληλουχία EGF-like αποτελείται από 40 αμινοξέα και περιέχει 6 καλά συντηρημένες κυστεΐνες, οι οποίες δημιουργούν μεταξύ τους τρεις δεσμούς θείου και ορισμένες από αυτές είναι πιθανές θέσεις O-γλυκοσυλίσωσης/φουκοσυλίσωσης (**Εικόνα 3.16A**).

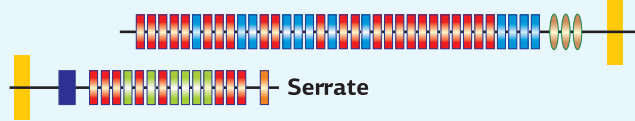
Η γλυκοσυλίσωση λαμβάνει χώρα στο ΕΔ και στο Golgi, όπου βρίσκονται και οι γλυκοσυλοτρανσφεράσες. Το ένζυμο φουκοσυλοτρανσφεράση (O-Fut) προσθέτει σε συγκεκριμένες EGF-αλληλουχίες την 1η φουκώζη που είναι απαραίτητη για έναν λειτουργικό υποδοχέα (**Εικόνα 3.17**). Αρνητική μετάλλαξη της O-Fut οδηγεί σε απώλεια της σηματοδότησης Notch. Η O-Fut εκτός από την ενζυμική της δράση δρα και ως πρωτεΐνη-συνοδός, βοηθώντας την αναδίπλωση και τη μεταφορά του Notch από το ΕΔ στο Golgi. Η O-Fut που έχασε την ενζυμική της δράση λόγω μετάλλαξης στο ενεργό κέντρο, διατηρεί την ικανότητα συνοδείας του Notch.

Μετά την προσθήκη της 1ης φουκώζης η αλυσίδα επιμηκύνεται από διαφο-

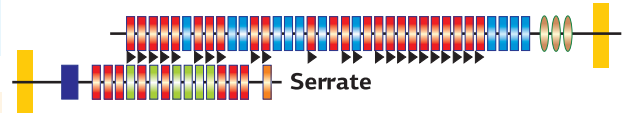
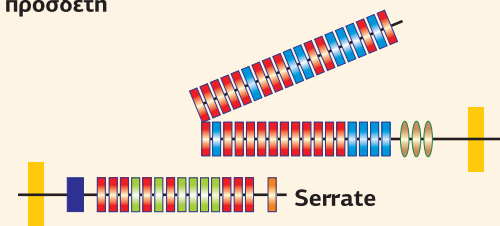
B**EGF-like domain**

Μοντέλο 1

Η απουσία φουκοσυλίσωσης εμποδίζει τη σύνδεση του προσδέτη χωρίς να επηρεάζει τη διαμόρφωση του Notch

**Μοντέλο 2**

Η απουσία φουκοσυλίσωσης μεταβάλλει τη διαμόρφωση του Notch, και η νέα διαμόρφωση δεν ευνοεί τη σύνδεση του προσδέτη



Η φουκοσυλίσωση είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του Notch από τους προσδέτες του

Εικόνα 3.17

Μια σχηματική αναπαράσταση του εξωκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch και του προσδέτη Serrate και δύο προτεινόμενα μοντέλα για το πώς η γλυκοσυλίσωση επηρεάζει τη σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα. Οι αλληλουχίες EGF-like με συνδεδεμένη O-φουκόζη εμφανίζονται με κόκκινο. Οι O-φουκόζες (εμφανίζονται ως μαύρα τρίγωνα) δρουν αυξάνοντας την ικανότητα συγκεκριμένων προσδετών, όπως η Serrate, να συνδέονται στον Notch. Σύμφωνα με το μοντέλο 1, η απουσία φουκοσυλίσωσης εμποδίζει τη σύνδεση του προσδέτη, παρότι δεν επηρεάζει τη διαμόρφωση του Notch, γιατί οι προσδέτες είναι λεκτίνες που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα γλυκάνες O-φουκόζης. Στο μοντέλο 2, η απουσία φουκοσυλίσωσης μεταβάλλει τη διαμόρφωση του Notch και η νέα διαμόρφωση δεν ευνοεί τη σύνδεση του προσδέτη. [15]

ρετικές γλυκοσυλοτρανσφεράσες, οι οποίες προσθέτουν διάφορους τύπους υδατανθράκων είτε N-γλυκάνες που συνδέονται σε ασπαραγίνες είτε O-γλυκάνες (O-φουκόζη, O-γλυκόζη, O-GlcNAc και O-ξυλόζη) που συνδέονται σε σερίνες και θρεονίνες (Εικόνα 3.16B). Καθώς η περιοχή EGF11-12 είναι η θέση σύνδεσης του προσδέτη, η γλυκοσυλίσωση των αλληλουχιών αυτών έχει σοβαρή επίδραση στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Μόλις πριν από 10 περίπου χρόνια η δραστηριότητα του Notch δείχθηκε να ρυθμίζεται από την Fringe μέσω της προσθήκης N-ακετυλογλυκοζαμινών (O-GlcNAc) στην 1η φουκόζη συγκεκριμένων EGF-like αλληλουχιών. Από τότε έχουν αναγνωρισθεί 9 γλυκοσυλοτρανσφεράσες που είναι υπεύθυνες για την προσθήκη γλυκανών σε αλληλουχίες EGF-like του Notch, και ο ρυθμιστικός ρόλος τους στη δραστηριότητα του Notch έχει επιβεβαιωθεί.

1. Fringe: εμποδίζει την ενεργοποίηση του Notch από την Serrate, ενώ διευκολύνει τη σύνδεση της Delta

Η πρωτεΐνη Fringe ανακαλύφθηκε στη *Drosophila* και το όνομά της (fringe, φράντζα) το πήρε από την ικανότητά της να ρυθμίζει τον σχηματισμό των τριχών κατά μήκος του οριακού τμήματος, στην ακμή του φτερού. Είναι μια N-ακετυλογλυκοζαμινοτρανσφεράση, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη του συστήματος trans-Golgi και προσθέτει N-ακετυλογλυκοζαμίνες (O-GlcNAc) στην 1η φουκόζη συγκεκριμένων EGF-like αλληλουχιών του εξωκυτταρικού τμήματος του Notch, όσο αυτό ωριμάζει στο δίκτυο του trans-Golgi. Ενώ η αρχική γλυκοσυλίσωση του Notch και η προσθήκη φουκόζης είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή σήματος μετά τη σύνδεση των προσδετών, οι μετέπειτα τροποποιήσεις από τη Fringe διαμορφώνουν την απόκριση του Notch σε συγκεκριμένους προσδέτες: μέσω της γλυκοσυλίσωσης η Fringe εμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch από τον προσδέτη Serrate, ενώ διευκολύνει τη σύνδεση του προσδέτη Delta.

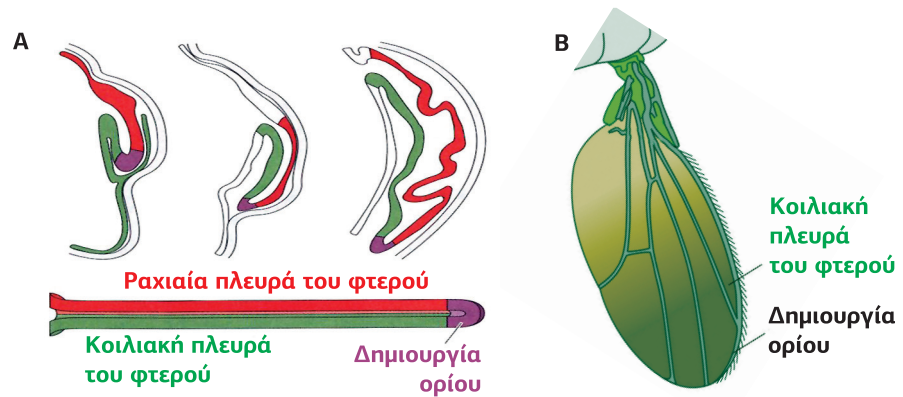
Χαρακτηριστική είναι η **δράση της Fringe στη δημιουργία ορίων** (boundary formation), για παράδειγμα ειδικά διαφοροποιημένων τριχοειδών κυττάρων, στο φτερό της *Drosophila*. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φτερού, αυτό χωρίζεται σε ραχιαία και κοιλιακά διαμερίσματα, τα οποία θα διαφοροποιηθούν στις δυο πλευρές του ώριμου φτερού (Εικόνα 3.18).

Ο υποδοχάς Notch εκφράζεται και στα ραχιαία και στα κοιλιακά κύτταρα. Ωστόσο, η Fringe και ο προσδέτης Serrate εκφράζονται μόνο στα ραχιαία κύτταρα,

Οι **λεκτίνες** είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται σε υδατάνθρακες και εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση σε συγκεκριμένες ομάδες σακχάρων. Παίζουν σημαντικό ρόλο ως μόρια αναγνώρισης και προσκόλλησης των κυττάρων. Βλέπε σελ. 692, CD22.

Εικόνα 3.18

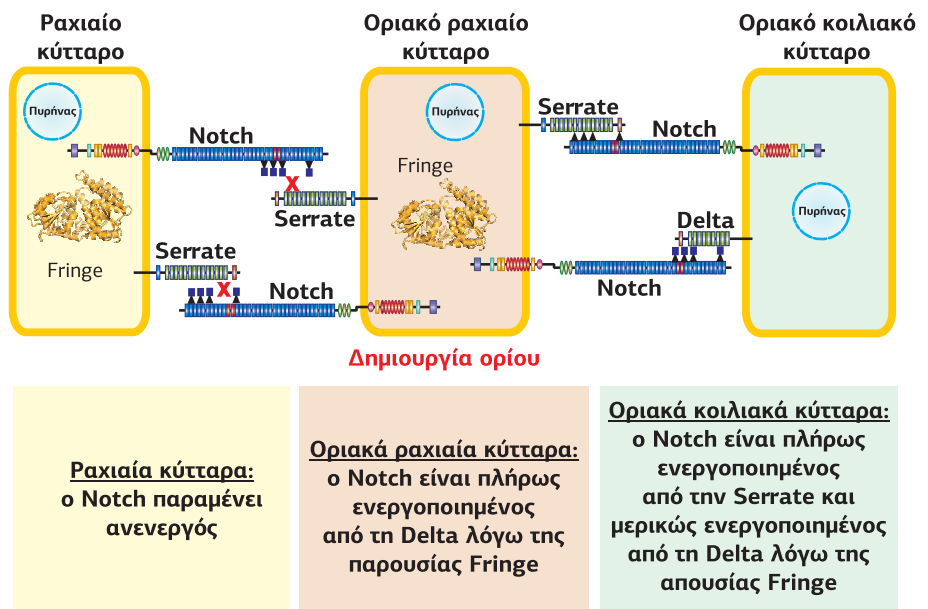
A. Στο αναπτυσσόμενο φτερό της *Drosophila* με κόκκινο είναι τα κύτταρα που θα δημιουργήσουν τη ραχιαία πλευρά του φτερού, με πράσινο την κοιλιακή και με μοβ την οριακή περιοχή. B. Διακρίνεται το φτερό της *Drosophila*. Η επίδραση της Fringe στα κύτταρα του φτερού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας οριακής περιοχής μεταξύ των κοιλιακών και των ραχιαίων κυττάρων, στην οποία τα κύτταρα έχουν τριχίδια.



ενώ ο προσδέτης Delta μόνο στα κοιλιακά κύτταρα. Στα ραχιαία κύτταρα η Fringe γλυκοσυλιώνει τον Notch και εμποδίζει την ενεργοποίησή του από την Serrate, τον μόνο προσδέτη που υπάρχει στα ραχιαία. Συνεπώς, στα ραχιαία κύτταρα ο Notch είναι ανενεργός. Στα οριακά ραχιαία κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με τα κοιλιακά, αν και η Fringe γλυκοσυλιώνει τον Notch, αυτός μπορεί να ενεργοποιη-

Εικόνα 3.19

Ο ρόλος της Fringe στη δημιουργία ορίων (boundary formation). Στα οριακά ραχιαία κύτταρα ο Notch ενεργοποιείται από την Delta των γειτονικών, οριακών κοιλιακών κυττάρων, ενώ στα οριακά κοιλιακά κύτταρα ο Notch ενεργοποιείται από την Serrate των γειτονικών, οριακών ραχιαίων κυττάρων. Στα υπόλοιπα ραχιαία κύτταρα, στα οποία υπάρχει μόνο η Serrate και η Fringe, ο Notch δεν ενεργοποιείται, ενώ στα κοιλιακά ενεργοποιείται μερικώς. Η Fringe και η Serrate εκφράζονται στη ραχιαία πλευρά, η Delta στην κοιλιακή πλευρά, ενώ ο Notch και στις δύο. [6] [15]

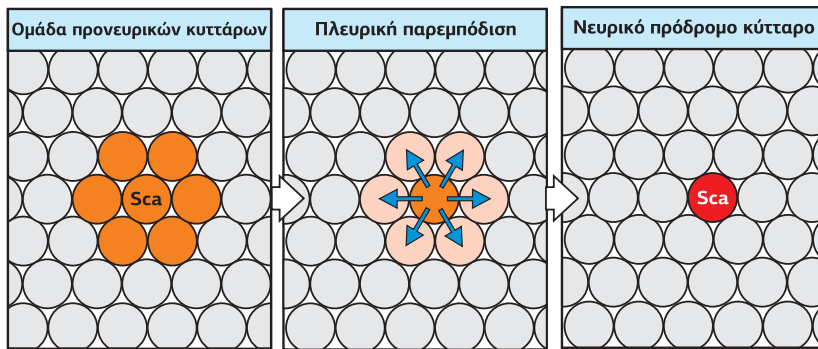


θεί από την Delta των γειτονικών κοιλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι που δημιουργούν την οριακή περιοχή μεταξύ των δύο πλευρών του φτερού. Τα οριακά κοιλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από την Serrate των οριακών ραχιαίων κυττάρων, καθώς δεν περιέχουν Fringe. Όσον αφορά τα υπόλοιπα κοιλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται μερικώς από την Delta των κοιλιακών με τα οποία βρίσκονται σε επαφή, καθώς αυτά δεν εκφράζουν την Fringe, η οποία διευκολύνει τη σύνδεση Notch-Delta (**Εικόνα 3.19**).

Συνεπώς, ενώ όλα τα κύτταρα του φτερού εκφράζουν τον υποδοχέα Notch, η μοίρα τους διαφοροποιείται από την έκφραση αρνητικών ή θετικών ρυθμιστών της Notch σηματοδότησης.

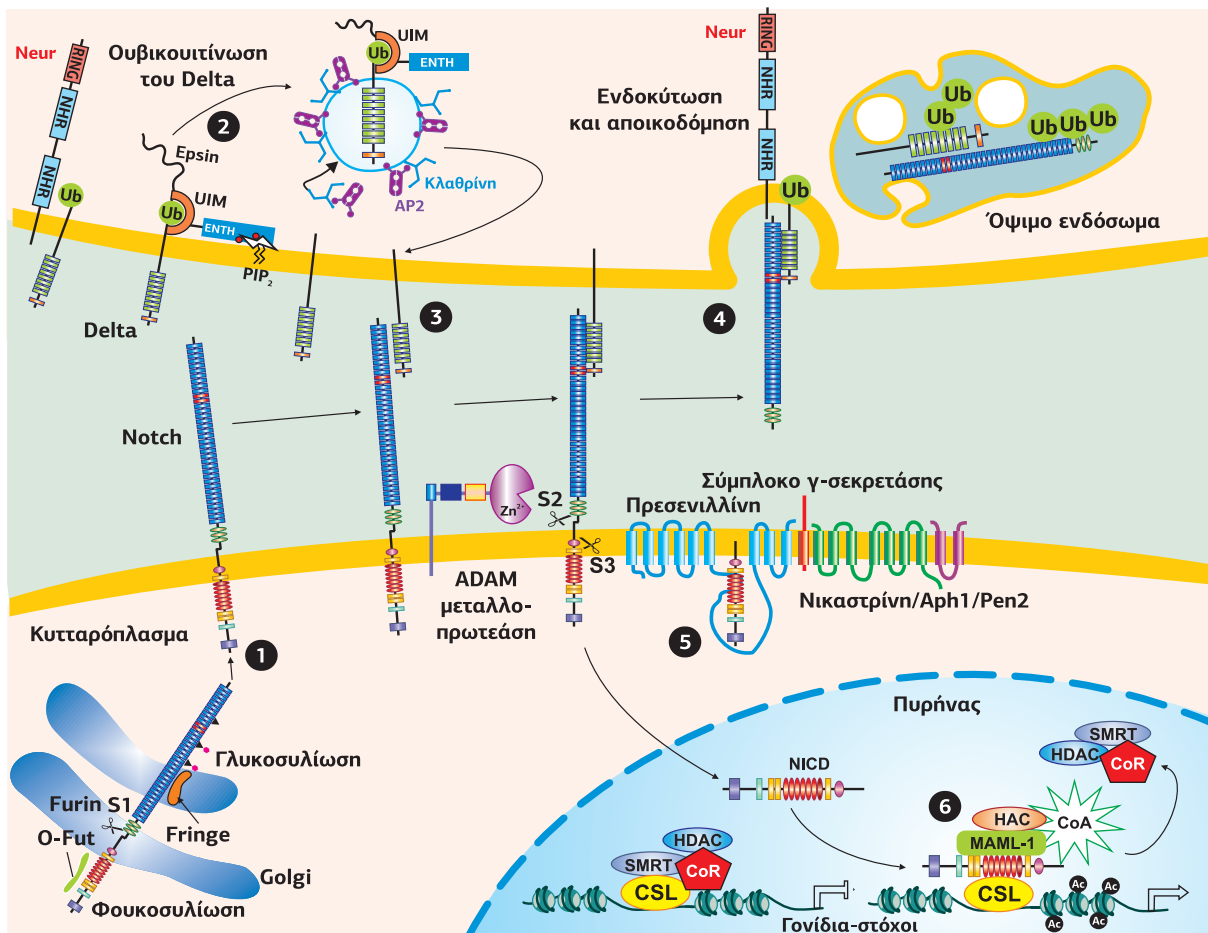
2. Scabrous

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη Scabrous αλληλεπιδρά με το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα Notch, σταθεροποιώντας το στην κυτταρική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα εμποδίζει την αποκοπή του ενδοκυτταρικού τμήματος του υπο-

**Εικόνα 3.20**

Επίδραση της Scabrous στη διαφοροποίηση μιας ομάδας προνευρικών κυττάρων, μέσω της σηματοδότησης Notch.

Στο προνευρικό κύτταρο που εκφράζει τη Scabrous (Sca) ο Notch υποδοχέας δεν ενεργοποιείται κι έτσι διαφοροποιείται σε νευρικό (ανοιχτό γκρι). Τα γειτονικά του κύτταρα, που δεν έχουν την Scabrous, γίνονται επιδερμικά (γαλάζιο), αφού ο Notch υποδοχέας λειτουργεί κανονικά.

**Εικόνα 3.21**

Πολλαπλές ενζυμικές δραστηριότητες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω του Notch.

- Ο Notch στην κυτταρική μεμβράνη βρίσκεται ως γλυκοσυλιωμένο ετεροδιμερές που προκύπτει μετά το S1 κόψιμο της πρωτεΐνης από την Furin-like πρωτεάση και τη γλυκοσυλίωσή του από την O-Fut και τη Fringe, στο Golgi. Η ενεργοποίηση του Notch ξεκινά με τη σύνδεση του προσδέτη (Delta). Το εξωκυτταρικό τμήμα του Notch αποκόβεται και ενδοκυτταρώνεται μαζί τη Delta. Απαραίτητη για την ύπαρξη ενεργοποιημένου προσδέτη είναι η ενδοκυττάρωση και ανακύκλωσή του από τις E3 λιγάσες της ουβικουτίνης Neuralized και Mind bomb.
- S2 πρωτεόλυση από την ADAM μεταλλοπρωτεάση Kuzbanian, μετά τη σύνδεση του προσδέτη.
- S3 πρωτεόλυση του ενδοκυτταρικού Notch από το σύμπλεγμα γ-σεκρετάσης, που περιέχει τις μεμβρανικές πρωτεΐνες προσενιλίνη, νικαστρίνη, Aph1 και Pen2. Το NICD απελευθερώνεται και μεταφέρεται στον πυρήνα.
- Στον πυρήνα το NICD συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα CSL, ο οποίος απουσία NICD δρα ως καταστολέας της μεταγραφής γονιδίων, απελευθερώνεται το co-repression complex (CoR) και η αποακετυλάση ιστονών (HDAC) και προσελκύνονται το σύμπλοκο συνενεργοποίησης (CoA, coactivator) ο μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιητής της μεταγραφής MAML1 και μια ακετυλοτρανσφεράση ιστονών (HAC), η οποία ανοίγει τη χρωματίνη και επιτρέπει τη μεταγραφή. [12]

δοχεία μετά τη σύνδεση του προσδέτη αναστέλλοντας τη σηματοδότηση του Notch.

Η επίδραση της Scabrous στη σηματοδότηση μέσω Notch μελετήθηκε εκτενώς στα πρόδρομα κύτταρα αισθητηρίων οργάνων (SOPs, Sensory Organ Precursors). Ορισμένα απ' αυτά τα κύτταρα εκφράζουν την Scabrous, η οποία εμποδίζει τη σηματοδότηση Notch, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να γίνονται νευρικά. Αντιθέτως, στα γειτονικά τους κύτταρα, στα οποία δεν εκφράζεται η Scabrous, ο υποδοχέας Notch ενεργοποιείται εμποδίζοντας τον νευρικό τους προσανατολισμό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται πλευρική παρεμπόδιση (lateral inhibition) (**Εικόνα 3.20**).

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η Scabrous μπορεί να επιδρά στη σηματοδότηση του Notch με τον ίδιο τρόπο που δρα και η Fringe, γλυκοσυλιώνοντας δηλαδή τον υποδοχέα Notch και αναστέλλοντας τη σύνδεση του προσδέτη.

4. Λειτουργικός Ρόλος του Notch

Ο υποδοχέας Notch αποδεδειγμένα λαμβάνει μέρος στις αναπτυξιακές διαδικασίες σχεδόν όλων των ιστών του οργανισμού. Η σηματοδότηση Notch απαιτείται για τη ρύθμιση της πολικότητας, για παράδειγμα, η απώλεια της σηματοδότησης Notch προκαλεί μη φυσιολογική πρόσθια-οπίσθια πολικότητα σε σωμίτες, αλλά και αριστερή-δεξιά ασυμμετρία στα σπονδυλωτά. Σε προεμβρυακό στάδιο η σηματοδότηση Notch παίζει κύριο ρόλο στην έναρξη σχηματισμού του Π.Ν.Σ., τη σπερματογένεση, την ωογένεση, τη μυογένεση, την αγγειογένεση, τη μορφοποίηση του καρδιαγγειακού και του ενδοκρινούς συστήματος και άλλων οργάνων, ενώ μελέτες στη *Drosophila* απέδειξαν πως καθοριστικός είναι ο ρόλος της στον σχηματισμό του ματιού και των φακών του.

Εκτός όμως από τη δράση του Notch στις αναπτυξιακές διαδικασίες σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος του σε αποπτωτικά προγράμματα του οργανισμού, καθώς και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Παρατηρήθηκε πως τα σήματα αυτά έχουν απλά δράση αναστολέα της απόπτωσης του κυττάρου, χωρίς όμως να προάγουν διαδικασίες που θα οδηγήσουν σε καρκινογένεση (φυσικά με τη δράση τους αυτή διευκολύνουν την ανάπτυξη του καρκίνου), ενώ υπερέκφρασή τους μπορεί να οδηγήσει σε υπερτροφία οργάνων.

Τι είναι όμως αυτό που καθορίζει το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των υποδοχέων Notch στον προσανατολισμό που θα πάρει το βλαστικό κύτταρο; Το είδος του προσδέτη, καθώς και ο υπότυπος του υποδοχέα Notch που θα ενεργοποιηθεί, θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση μεταγραφής διαφορετικών γονιδίων-στόχων, που θα επηρεάσουν τη μοίρα του κυττάρου.

Στη συνέχεια, θα αναπτύξουμε τον ρόλο της σηματοδότησης Notch στη διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος και στην ωρίμανση των Τ-λεμφοκυττάρων.

Νευρογλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία: τα κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με τους νευρώνες, δεν παράγουν δυναμικά δράσης και δεν σχηματίζουν συνάψεις με άλλα κύτταρα. Είναι σημαντικά για τη διατήρηση και τη βιωσιμότητα των νευρώνων. Σε αντίθεση με τους νευρώνες διατηρούν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται με μитώσεις σε όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού.

Αστροκύτταρα: τα μεγαλύτερα κύτταρα της νευρογλοίας, εφοδιασμένα με πολυάριθμες μακριές αποφυάδες. Έχουν σφαιρικούς, κεντρικά τοποθετημένους πυρήνες. Προσφέρουν κάποια δομική στήριξη για τον νευρικό ιστό. Υπάρχουν δύο τύποι αστροκυττάρων: τα πρωτοπλασματικά, που βρίσκονται στη φαιά ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, και τα ινώδη αστροκύτταρα.

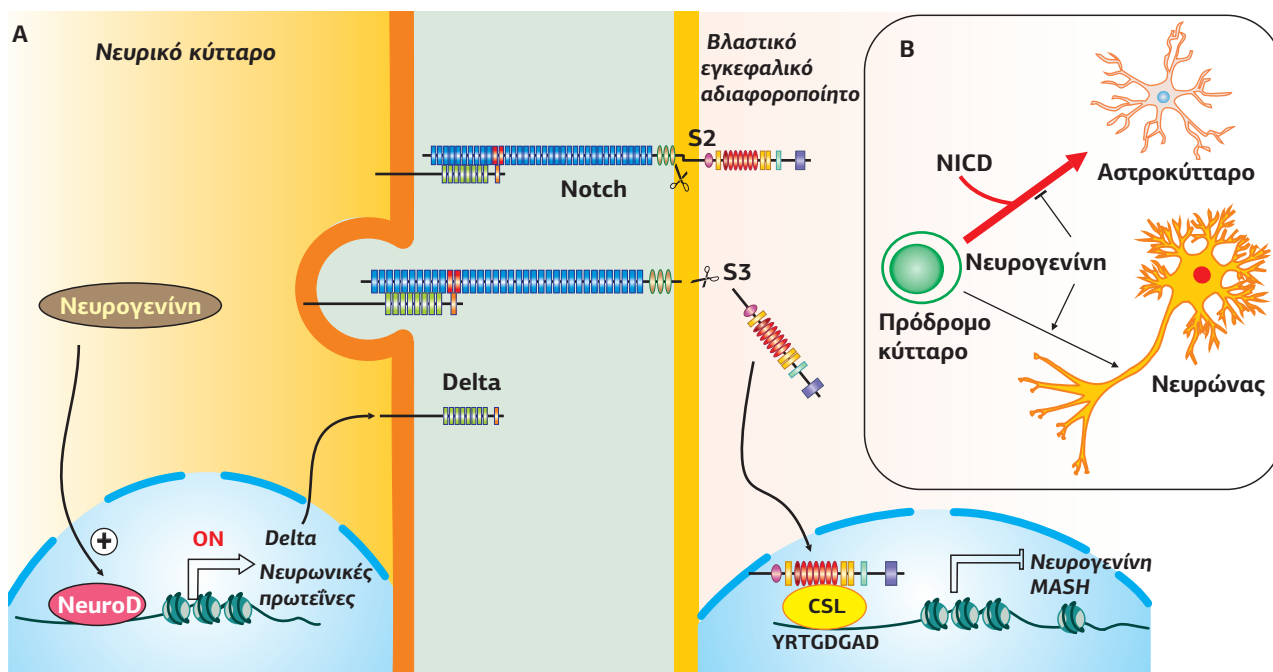
4.1

Ο Notch επάγει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε νευρογλοιακά

Εκτός από τον κλασικό ρόλο του Notch να εμποδίζει τη διαφοροποίηση των βλαστικών εξωδερμικών κυττάρων σε νευρώνες (**Εικόνα 3.22A**), η ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch προωθεί τη διαφοροποίηση των αδιαφοροποιήτων βλαστικών κυττάρων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος σε νευρογλοιακά κύτταρα.

Notch και γένεση των αστροκυττάρων

Έρευνες έδειξαν ότι εισάγοντας την ενδοκυτταρική περιοχή του Notch σε εμβρυϊκά εγκεφαλικά κύτταρα ποντικού 9ης μέρας, με τη βοήθεια ενός ρετροϊού, τα κύτταρα που τελικά δέχονται το NICD διαφοροποιούνται σε γλοιακά. Επίσης, ο Tanigaki (2001) έδειξε ότι και στον ώριμο εγκέφαλο ο Notch μπορεί να ενεργο-



ποιήσει τη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων σε γλοιακά κύτταρα (κυρίως σε αστροκύτταρα) (Εικόνα 3.22).

Όπως είδαμε, το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch όταν εισέρχεται στον πυρήνα αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα CSL και ενεργοποιεί την παραγωγή πρωτεϊνών HES (Hairy/Enhancer of Split), οι οποίες αναστέλλουν τη μεταγραφή των προ-νευρικών γονιδίων των πρωτεϊνών MASH και νευρογενίνη.

Αρνητικές μεταλλάξεις στα γονίδια, που κωδικοποιούν τις προνευρικές πρωτεΐνες MASH και νευρογενίνη, σε ποντίκια προκάλεσαν πρώιμη γένεση αστροκυττάρων. Επίσης, βλαστικά κύτταρα με απενεργοποιημένα τα γονίδια της νευρογενίνης και της MASH εξελίσσονται σε αστροκύτταρα. Συνεπώς, η κανονική λειτουργία των υποδοχών που προκαλεί παρεμπόδιση της δράσης των προνευρικών πρωτεϊνών οδηγεί σε γένεση αστροκυττάρων, ενώ η υπολειτουργία τους στη δημιουργία νευρώνων.

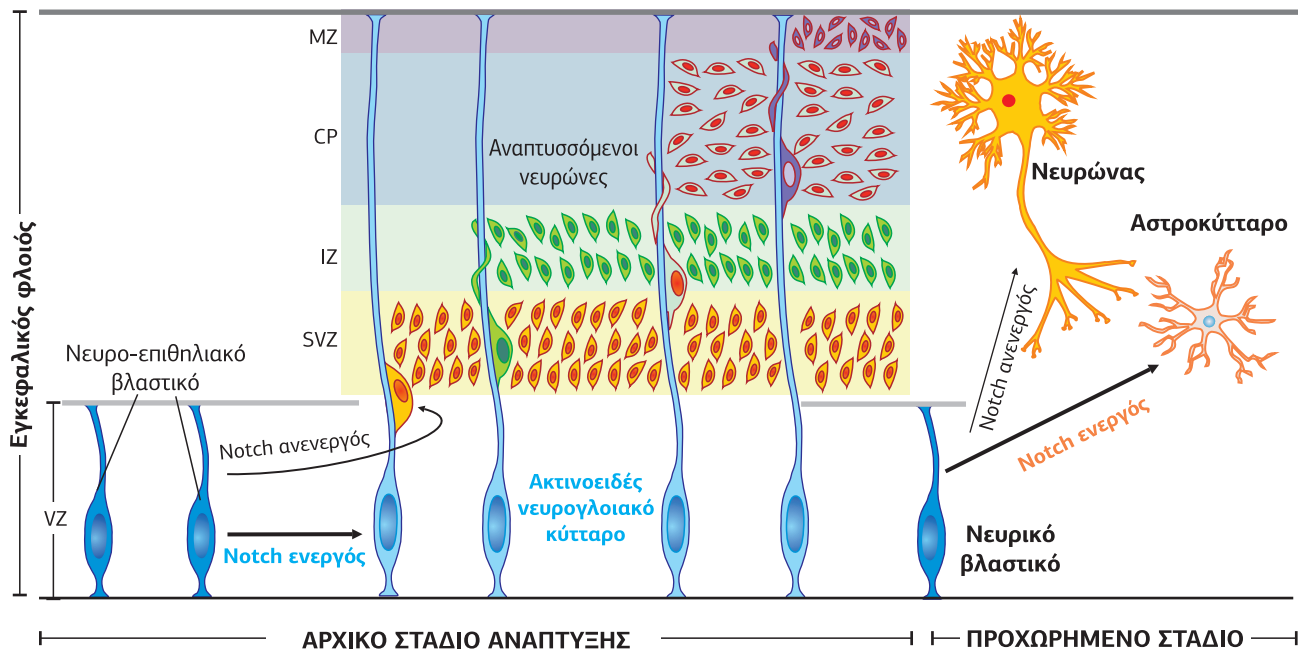
Notch και γένεση των ακτινοειδών γλοιοκυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη του εγκεφαλικού φλοιού (VZ, Ventricular Zone) παράγουν νευρώνες και γλοία σε διαφορετικές χρονικές στιγμές στη διάρκεια της ανάπτυξης. Για παράδειγμα, στον αρουραίο παράγουν νευρώνες από την αρχή της ανάπτυξης έως την 19η ημέρα πριν από τη γέννηση, όπου και σταματάει η νευρογένεση. Καθώς η παραγωγή νευρώνων μειώνεται, αρχίζουν να παράγονται αστροκύτταρα έως την 9η ημέρα μετά τη γέννηση και ολιγοδενδροκύτταρα έως την 21η ημέρα.

Παράλληλα με τους νευρώνες, παράγεται και ένας ιδιαίτερος τύπος κυττάρων, τα ακτινοειδή γλοιοκύτταρα (radial glia), τα οποία σχηματίζουν ένα είδος “σκαλωσιάς” που την χρησιμοποιούν οι νευρώνες για να μεταφερθούν από την κοιλιακή στην εξωτερική στιβάδα του εγκεφαλικού φλοιού (Εικόνα 3.23). Τα βλαστικά μετατρέπονται σε ακτινοειδή γλοιοκύτταρα, όταν ενεργοποιηθεί ο Notch. Ωστόσο, η μοίρα ενός ακτινοειδούς γλοιοκυττάρου δεν είναι μια τελική κατάσταση διαφοροποίησης. Όταν τελειώσει η μεταφορά των νευρώνων στον εξωτερικό φλοιό, τα ακτινοειδή γλοιοκύτταρα επανακτούν τις βλαστικές τους ιδιότητες. Σε ένα μεταγενέστερο στάδιο της ανάπτυξης τα βλαστικά κύτταρα αρχίζουν πάλι να διαιρούνται. Τα κύτταρα, στα οποία ενεργοποιείται ο υποδοχέας Notch, μετατρέπονται σε αστροκύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα μετατρέπονται σε νευρώνες.

Εικόνα 3.22

Α. Όταν ένα βλαστικό κύτταρο πρόκειται να μετατραπεί σε νευρώνα, η νευρογενίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου αφενός ενεργοποιεί τη μεταγραφή του μεταγραφικού παράγοντα NeuroD (ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την παραγωγή πρωτεϊνών που θα προσδώσουν τον νευρικό φαινότυπο) και αφετέρου ενεργοποιεί την παραγωγή του Delta. Ο Delta συνδέεται στον Notch των γειτονικών βλαστικών κυττάρων, οδηγώντας στην αποκοπή του NICD. Ο NICD εισέρχεται στον πυρήνα, όπου αναστέλλει την παραγωγή της νευρογενίνης, εμποδίζοντας τη νευρική μοίρα του κυττάρου. Β. Η εισαγωγή του NICD σε ένα αδιαφοροποίητο βλαστικό κύτταρο προκαλεί τη διαφοροποίησή του σε αστροκύτταρο. Αντιθέτως, αν το βλαστικό κύτταρο καλλιιεργηθεί παρουσία νευρογενίνης, μετατρέπεται σε νευρικό. [31]

**Εικόνα 3.23**

Διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων στον εγκεφαλικό φλοιό. Ο φλοιός του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αποτελείται από έξι στιβάδες – ζώνες. Η κοιλιακή ζώνη (VZ, Ventricular Zone) περιέχει τα αναπτυσσόμενα νευροεπιθηλιακά βλαστικά κύτταρα και η υποκοιλιακή ζώνη (SVZ, Subventricular Zone) είναι μια ζώνη έντονου πολλαπλασιασμού. Στη συνέχεια, οι νευρώνες μεταναστεύουν ακτινωτά κατά μήκος των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας (radial glia) από την VZ, μέσω της διάμεσης ζώνης (IZ, intermediate Zone), και της φλοιϊκής πλάκας (CP, cortical plate) στην οριακή ζώνη (MZ, marginal zone).

Στο αρχικό στάδιο της ανάπτυξης τα βλαστικά κύτταρα, στα οποία ο Notch δεν λειτουργεί, δίνουν γένεση σε νευρώνες, ενώ εκείνα στα οποία ο Notch ενεργοποιείται, διαφοροποιούνται σε ακτινοειδή γλοιοκύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται από τους νευρώνες ως "σκαλωσιά" για τη μεταφορά τους στην εξωτερική στιβάδα του εγκεφαλικού φλοιού.

Σε ένα προχωρημένο στάδιο τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε νευρώνες, όταν ο Notch είναι ανενεργός, ενώ όταν η σηματοδότηση Notch λειτουργεί, διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα.

[22]

Συνοψίζοντας, η δραστηριότητα του Notch μπορεί να περιγραφεί ως μια αντι-νευρωνική επίδραση στα προνευρικά βλαστικά κύτταρα, αλλά το αν αυτή η επίδραση καταλήγει σε εξειδίκευση γλοιακών κυττάρων, εξαρτάται από το χωρικό και χρονικό πλαίσιο κάθε κυττάρου.

4.2

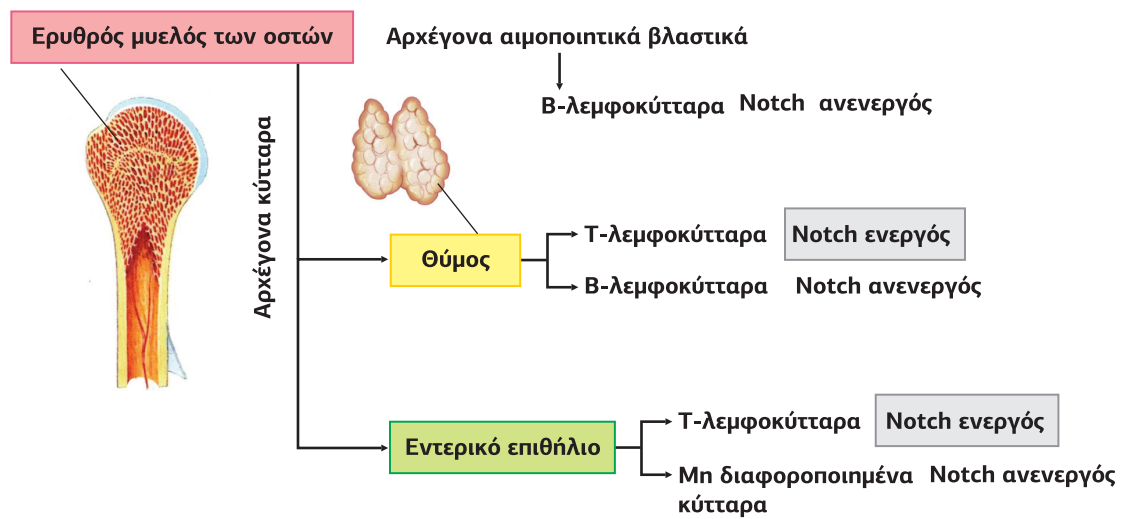
Ο Notch ελέγχει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε T- και B- λεμφοκύτταρα, στον μυελό των οστών, στον θύμο και στο εντερικό επιθήλιο

Τα λεμφοκύτταρα είναι μια κατηγορία κυττάρων του αίματος που παράγονται στον ερυθρό μυελό των οστών. Διακρίνονται σε τρεις τύπους: τα B-λεμφοκύτταρα, που ωριμάζουν στον μυελό των οστών και μεταφέρονται μέσω του αίματος στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από κοινά λεμφοειδή κύτταρα (CLP) που εγκαταλείπουν τον μυελό των οστών κατά την εμβρυϊκή ηλικία και μεταφέρονται στον θύμο αδένος για να ωριμάσουν σε T-λεμφοκύτταρα, και τα NK κύτταρα (φυσικά φονικά κύτταρα), τα οποία προέρχονται από τον μυελό των οστών, αλλά οι πρόγονοί τους και η ιστορία τους δεν είναι ακόμα σαφής.

Οι υποδοχείς Notch ελέγχουν τη μοίρα των λεμφοκυττάρων, προωθώντας τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών σε T-λεμφοκύτταρα, εμποδίζοντας την ανάπτυξή τους σε B-λεμφοκύτταρα (Εικόνα 3.24).

Ο Notch ελέγχει την ωρίμανση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών

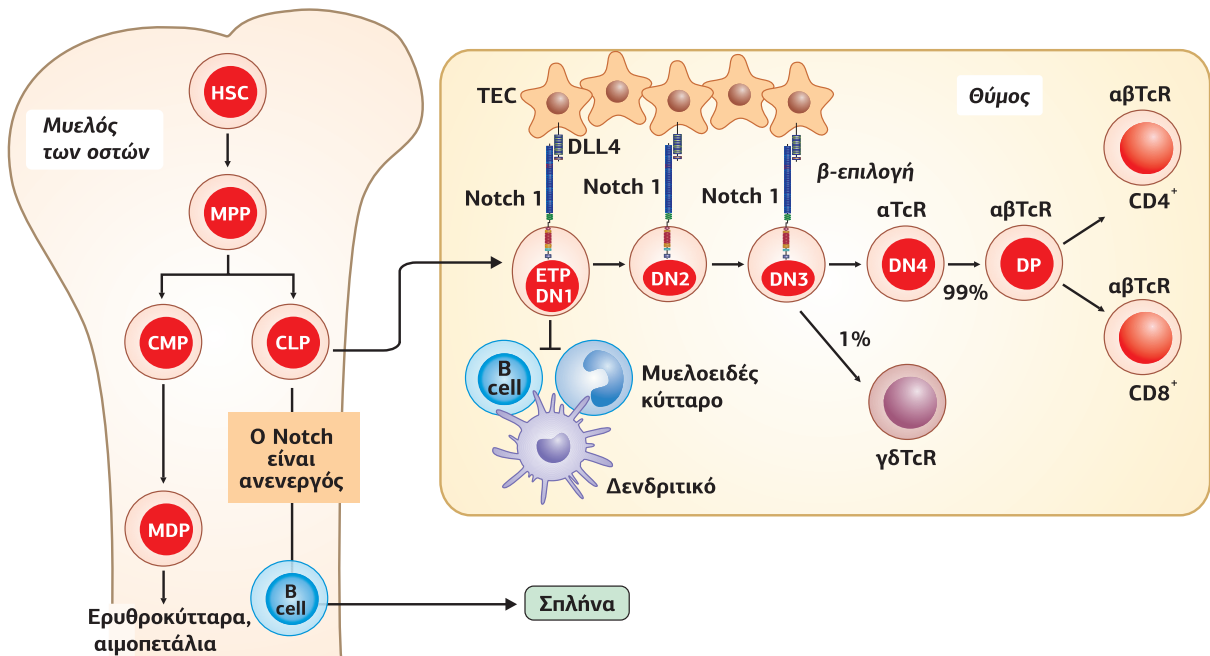
Ο ρόλος της σηματοδότησης Notch στην απόφαση διαφοροποίησης των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων στον μυελό των οστών ανακαλύφθηκε με μελέτες υπερέκφρασης ή μη-έκφρασης του Notch. Εισαγωγή του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch-1 (NICD) σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μη φυσιολογικού ανώριμου πληθυσμού T-λεμφοκυττάρων (κυρίως CD4⁺, CD8⁺) και αναστολή της ανάπτυξης B-λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως, απενεργοποίηση του Notch-1 σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών οδήγησε στην αναστολή της ανάπτυξης των T-λεμφοκυττάρων στον θύμο, στο στάδιο CD44⁺, CD25⁻, CD4⁻, CD8⁻ και στην εμφάνιση ανώριμων B-λεμφοκυττάρων



στον θύμο. Όταν ο κοινός πρόδρομος των λεμφοκυττάρων (Common Lymphoid Progenitor, CLP) εισέλθει στον θύμο, αλληλεπιδρά με τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC, Thymus Epithelial Cells), τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον προσδέτη Delta (DLL4). Ο Delta ενεργοποιεί τους υποδοχείς Notch-1 των CPLs και αναστέλλεται η Β-μοίρα των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα θυμοκύτταρα περνώντας από διάφορα στάδια θα ολοκληρώσουν την ωρίμανση και διαφοροποίησή τους σε Τ-λεμφοκύτταρα (Εικόνα 3.25).

Εικόνα 3.24

Η ελεγχόμενη από τον υποδοχέα Notch πορεία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων προς τη διαφοροποίηση.



Εικόνα 3.25

Τα αιμοποιητικά κύτταρα του ερυθρού μυελού των οστών (HSCs, Haematopoietic Stem Cells) μετατρέπονται σε πολυδύναμα προγονικά (MPPs, Multipotent Progenitors) πριν τη διαφοροποίησή τους στα κοινά μυελοειδή προγονικά κύτταρα (CMPs, Common Myeloid Progenitors) και στα κοινά λεμφοειδή προγονικά κύτταρα (CLPs, Common Lymphoid Progenitors). Τα CMPs διαφοροποιούνται σε MDP (Monocyte and Dendritic cell Progenitors), τα οποία θα δώσουν γένεση σε ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα. Τα CLPs από τον μυελό των οστών μεταναστεύουν στον θύμο, όπου μετατρέπονται σε ETPs (Early T-cell Precursors) και αλληλεπιδρούν με τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC, Thymus Epithelial Cells), τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον DLL4 (Delta-Like Ligand). Ο DLL4 ενεργοποιεί τους υποδοχείς Notch-1 των ETPs (DN1) και αναστέλλει τη Β-μοίρα των κυττάρων ενώ ενεργοποιεί την ωρίμανσή τους σε κύτταρα DN2 (Double-Negative 2). Στη συνέχεια, πάντα μέσω ενεργοποίησης του Notch, τα θυμοκύτταρα περνώντας από τα στάδια DN3 και DN4 διαφοροποιούνται μέσω της β-επιλογής σε DP. Η ενεργοποίηση του Notch είναι απαραίτητη και πάλι για τη διαφοροποίηση των DP (Double Positive) σε αβTcR. [36]

Συμπερασματικά, η σηματοδότηση Notch-1 αναστέλλει την ανάπτυξη των B-λεμφοκυττάρων, αλλά επιτρέπει ή προωθεί την ανάπτυξη T-λεμφοκυττάρων επηρεάζοντας τον κοινό αιμοποιητικό τους πρόδρομο.

Ο Notch ελέγχει την ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων στον θύμο

Ο Notch, εκτός από τη συμμετοχή του στην T- ή B-μείρα που θα ακολουθήσουν τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, είναι απαραίτητος και στο μονοπάτι που οδηγεί στην ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων, μέσα στον θύμο αδέν.

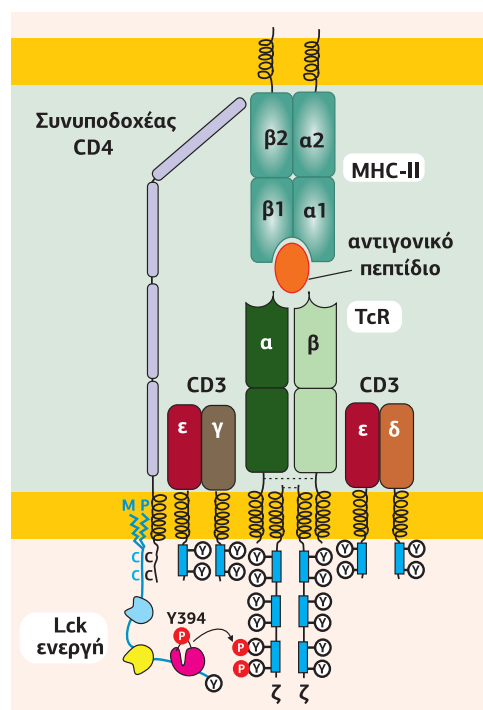
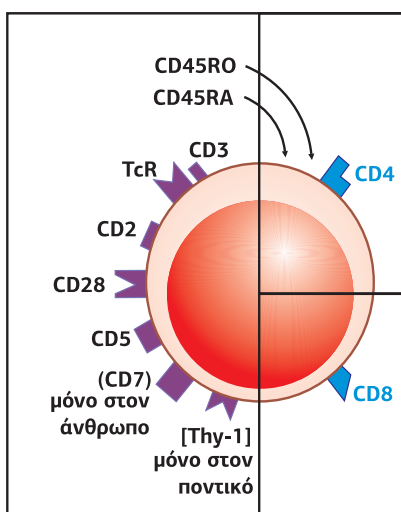
Τα προγονικά κύτταρα των λεμφοκυττάρων (CLP) μπαίνουν στον θύμο αδέν στο σημείο της ένωσης του φλοιού με τον μυελό του θύμου (φλοιομυελική συμβολή) και ξεκινούν την πορεία τους προς την ωρίμανση. Το 90% των αναπτυσσόμενων λεμφοκυττάρων βρίσκονται στον φλοιό, ενώ τα υπόλοιπα στον μυελό. Στον μυελό μεταναστεύουν για την τελική τους ωρίμανση.

Κατά την άφιξή τους στον θύμο τα ανώριμα T-λεμφοκύτταρα στερούνται όλων των επιφανειακών δεικτών που χαρακτηρίζουν τα ώριμα T-κύτταρα. Η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων αρχίζει από τη στιγμή που ξεκινούν να μεταγράφουν τις αλυσίδες (α , β , γ , δ , CD3) που δημιουργούν το σύμπλοκο του υποδοχέα TcR, τους συνυποδοχείς του (CD4/CD8), καθώς και βοηθητικά συνδεγερτικά μόρια (CD45RO, CD45RA, CD28, CD2), τα οποία αναγνωρίζουν διάφορους τύπους αντιγόνων και χαρακτηρίζουν και εξειδικεύουν τα T-λεμφοκύτταρα (Εικόνα 3.26).

Εικόνα 3.26

Επιφανειακοί δείκτες

T-λεμφοκυττάρων. Οι TcRs (T cell Receptors) είναι υποδοχείς που αποτελούνται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες ($\alpha\beta$ ή $\gamma\delta$), ανάλογα με το είδος των οποίων χαρακτηρίζεται και το είδος των T-λεμφοκυττάρων. Οι CD4 είναι συνυποδοχείς που χαρακτηρίζουν τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Οι CD8 είναι συνυποδοχείς που χαρακτηρίζουν τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Δεξιά διακρίνεται ο υποδοχέας TcR ($\alpha\beta$ και γ υπομονάδες) συνδεδεμένος με το πεπτίδιο-αντιγόνο που παρουσιάζει το σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (MHC, Classe II). Διακρίνονται οι αλυσίδες γ , δ , ϵ , ζ , καθώς και ο συν-υποδοχέας CD4, ο οποίος επίσης αναγνωρίζει το MHCII. [39]



Στον θύμο τα ανώριμα λεμφοκύτταρα περνούν από πέντε στάδια (DN1, DN2, DN3, DN4, DP) έως ότου καταλήξουν στην τελική τους μορφή (SP).

Στο στάδιο ETPs - DN1 (Double Negative 1) τα λεμφοκύτταρα έχουν μια δυναμική να διαφοροποιηθούν σε T-, B- ή NK. Κατά τη μετανάστευσή τους προς την εξωτερική μεμβράνη του φλοιού του θύμου, τα κύτταρα αρχίζουν να μεταγράφουν τις πρωτεΐνες που προορίζονται για την επιφάνεια της πλασματικής τους μεμβράνης. Στα στάδια DN2-4 γίνεται η ωρίμανση του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (TcR). Πρώτες αρχίζουν, σχεδόν ταυτόχρονα, οι αναδιατάξεις (rearrangement) του γενετικού υλικού που οδηγούν στη διαμόρφωση των γονιδίων των γ και δ αλυσίδων του TcR. Αν η αναδιάταξη του γονιδίου των γ -αλυσίδων ολοκληρωθεί επιτυχώς, κινητοποιείται η αναδιάταξη του γονιδίου των δ -αλυσίδων. Αν τα γ και δ γονίδια καταφέρουν να μεταγραφούν και να μεταφραστούν, η διαδικασία της αναδιάτα-

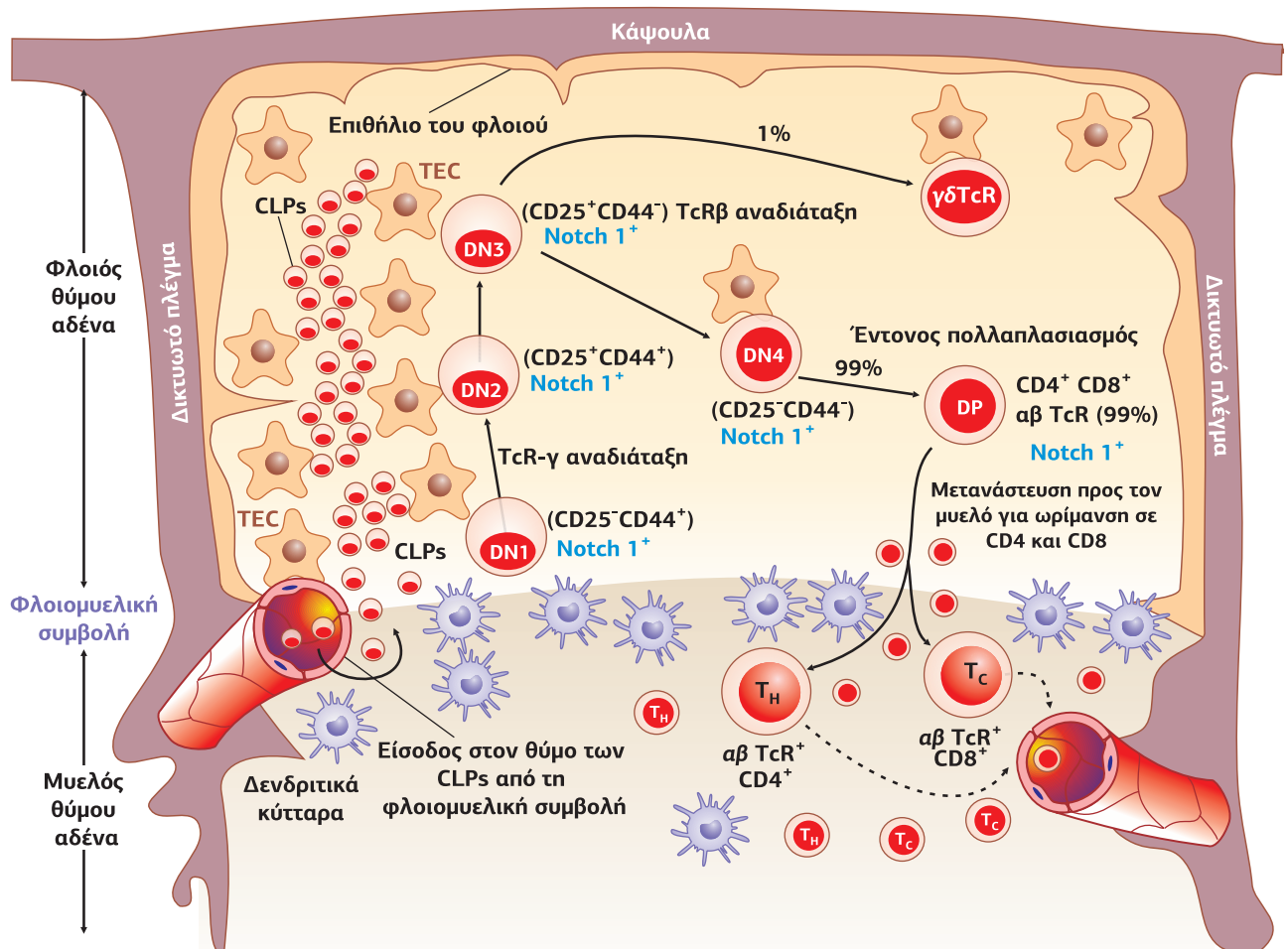
ξης σταματά και το κύτταρο εκφράζει **$\gamma\delta$ TcR** (μόνο το 1% των T-λεμφοκυττάρων εκφράζουν τον $\gamma\delta$ TcR). Έτσι τα $\gamma\delta$ TcR εμφανίζονται κατά τη διαφοροποίηση στον θύμο, νωρίτερα από τα $\alpha\beta$ TcR κύτταρα. Η αποτυχία της αναδιάταξης είτε του γ είτε του δ γονιδίου επιτρέπει να συνεχιστεί η αναδιάταξη του β -γονιδίου που ακολουθείται από εκείνη του α -γονιδίου. Αν και αυτές οι αναδιατάξεις αποτύχουν, δεν παράγεται υποδοχέας και το κύτταρο πεθαίνει.

Στο στάδιο DP (Double Positive) η $\alpha\beta$ γενιά κυττάρων (το 99% των T-λεμφοκυττάρων) αρχίζει να εκφράζει μικρό αριθμό των συνυποδοχέων CD4 και CD8. Αυτά τα διπλά θετικά θυμοκύτταρα μετακινούνται προς τον μυελό του θύμου, όπου υφίστανται θετική και αρνητική επιλογή. Η θετική επιλογή ή, όπως αλλιώς λέγεται, εκπαίδευση των λεμφοκυττάρων είναι αποτέλεσμα κρίσιμων αλληλεπιδράσεων των συνυποδοχέων των TcR, CD4 και CD8 με τα MHC των επιθηλιακών κυττάρων του μυελού του θύμου. Από τη διαδικασία αυτή επιβιώνουν μόνο όσα κύτταρα συνδέονται με τα MHC με μια συγκεκριμένη συγγένεια. Τα υπόλοιπα που συνδέονται με μικρότερη ή μεγαλύτερη συγγένεια καταστρέφονται με απόπτωση (Εικόνα 3.27).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα διπλά θετικά θυμοκύτταρα χάνουν τον έναν από τους δύο συνυποδοχείς (CD4 ή CD8) δεν είναι πλήρως γνωστοί. Έχει προταθεί ότι η επιλογή του συνυποδοχέα που θα παραμείνει στη μεμβράνη του θυμοκυττάρου καθορίζεται από την αλληλεπίδραση TcR/συνυποδοχέα/MHC. Συγκεκριμένα, αν κάποιος TcR επιτύχει να συνδεθεί, κάτω από άριστες συνθήκες, με ένα τάξης I MHC, σταματά η έκφραση του CD4 και το λεμφοκύτταρο διαφοροποιείται σε T-κυτταροτοξικό. Αντιστρόφως, αν κάποιος TcR επιτύχει να συνδεθεί, κάτω από άριστες συνθήκες, με ένα τάξης II MHC, σταματά η έκφραση του CD8 και το λεμφοκύτταρο διαφοροποιείται σε T-βοηθητικό.

Εικόνα 3.27

Η πορεία των αρχέγονων λεμφοκυττάρων προς τη διαφοροποίηση σε T-λεμφοκύτταρα μέσα στον θύμο αδένά και η συμμετοχή των Notch στα επιμέρους στάδια. [19]



Ο ακριβής ρόλος του Notch στην ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί πλήρως. Τρεις υπότυποι υποδοχέων Notch εκφράζονται στα θυμοκύτταρα: Notch-1, 2 και 3, ενώ η έκφρασή τους διαφέρει στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των T-λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του Notch-1 είναι μεγαλύτερη στο στάδιο DN, ελαττώνεται προοδευτικά στο στάδιο DP, με πολύ χαμηλή έκφραση στο στάδιο SP. Ο Notch-2 έχει αυξημένη έκφραση στα στάδια DN1, DN2 και, επιπλέον, εκφράζεται μαζί με τον Notch-1 στα γδΤ-λεμφοκύτταρα. Ο Notch-3 εκφράζεται στο στάδιο DN3.

Θα αναφερθούμε στον ρόλο του υποδοχέα Notch-1, καθώς είναι ο καλύτερα μελετημένος. Το γονίδιο Notch-1 εκφράζεται από τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών και η έκφρασή του αυξάνεται προοδευτικά μέχρι να φτάσει στο υψηλότερο επίπεδο στη φάση DN3, μετά την οποία σταδιακά μειώνεται. Ο θύμος παρέχει ένα ειδικό μικροπεριβάλλον όπου η σηματοδότηση του Notch-1 είναι συνεχώς διαθέσιμη μέσω της έκφρασης του προσδέτη DLL4 στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TECs). Η σηματοδότηση DLL4 - Notch-1 αναστέλλει τον B-προσανατολισμό των DN1 οδηγώντας στη διαφοροποίησή τους σε DN2. Διαγραφή του γονιδίου Notch-1 έχει ως αποτέλεσμα την αναπτυξιακή παύση στη φάση DN1. Η σηματοδότηση DLL4 - Notch-1 εμπλέκεται επίσης στη μετάβαση DN2-DN3, όπως φαίνεται στα θυμοκύτταρα ποντικών στα οποία το γονίδιο Notch-1 διαγράφεται μετά το τέλος της φάσης DN2. Απουσία του Notch-1 από τα κύτταρα DN2, η β-επιλογή εξασθενεί, με αποτέλεσμα την ανώμαλη ανάπτυξη των αβ T-λεμφοκυττάρων.

Τα ποντίκια Notch-1^{+/-} εμφανίζουν λιγότερα αβTcR κύτταρα από ό,τι τα ποντίκια Notch-1^{+/+}, υποθέτοντας ότι η σηματοδότηση Notch ευνοεί τη δημιουργία αβTcR λεμφοκυττάρων. Έχει προταθεί ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης τα λεμφοκύτταρα που δέχονται ένα σήμα μέσω του προ-TcR κυττάρου, επίσης δέχονται και ένα σήμα ενεργοποίησης του Notch-1, οδηγώντας το κύτταρο σε μια αβ-κατεύθυνση, ενώ τα λεμφοκύτταρα που δέχονται ένα σήμα μέσω του γδTcR, δεν δέχονται σήμα Notch-1, με αποτέλεσμα να διαφοροποιηθούν σε γδΤ-λεμφοκύτταρα. Η διαδικασία περιπλέκεται επιπλέον με τη διαφορετική έκφραση των 4 προσδέτων του Notch στα κύτταρα του θύμου (DLL1, DLL4, Jag1, Jag4). Ο προσδέτης που εκφράζεται με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι ο DLL4, ο οποίος συναντάται στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού του θύμου, αναστέλλοντας τη B-μοίρα των λεμφοκυττάρων, ενώ απουσιάζει εντελώς από τον μυελό του θύμου. Οι προσδέτες Jag1 και 2 φαίνεται να παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γδ μοίρας των T-λεμφοκυττάρων, καθώς αρνητικά μεταλλάγματα (Jag1^{+/-}) δεν επηρεάζουν τον αριθμό των αβTcR-λεμφοκυττάρων, ενώ μειώνουν αισθητά τον αριθμό των γδTcR λεμφοκυττάρων.

Τέλος, ο ρόλος των Notch στη διαφοροποίηση των αβTcR σε T_H και T_C παραμένει αμφιλεγόμενος. Ανενεργοί υποδοχείς Notch σε αβTcR λεμφοκύτταρα αυξάνουν τον αριθμό των ώριμων CD8⁺ λεμφοκυττάρων εις βάρος των CD4⁺. Αντιθέτως, υπερέκφραση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch αναστέλλει την ανάπτυξη και των T-βοηθητικών (με CD4⁺) και των T-κυτταροτοξικών (με CD8⁺).

Από την ανακάλυψη του γονιδίου του Notch στην *Drosophila*, σχεδόν πριν από 100 χρόνια, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στη διαλεύκανση του κεντρικού μηχανισμού του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης Notch. Πρόσφατες μελέτες γονιδιωμικής αποκαλύπτουν ένα εξαιρετικά πολύπλοκο δίκτυο γονιδίων, που μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του Notch στη *Drosophila*, και αυτή η ομάδα των γονιδίων συμπληρώνεται και επεκτείνεται από μελέτες σε άλλους οργανισμούς. Αυτό το εξαιρετικά διασυνδεδεμένο δίκτυο έρχεται σε αντίθεση με οποιαδήποτε συμβατική άποψη του μονοπατιού σηματοδότησης Notch ως μια απλή γραμμική αλληλουχία των γεγονότων. Παρά το γεγονός ότι έχουμε τώρα μια εικόνα για τον τρόπο με τον οποίο ένας τέτοιος μηχανισμός σηματοδότησης ελέγχεται από το γονιδίωμα, βρισκόμαστε αντιμέτωποι με σοβαρές προκλήσεις όσον αφορά την ανάλυση των βασικών μοριακών μηχανισμών ελέγχου του σήματος Notch. Ωστόσο, η προσέγγιση σε επίπεδο συστημάτων θα ρίξει φως στο πολύπλοκο κύκλωμα που

ρυθμίζει αυτό το μονοπάτι, καθώς και στους μηχανισμούς που σχετίζονται με παθολογίες που οφείλονται στη δυσλειτουργία του Notch.

Βιβλιογραφία

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science* **284**: 770-776 (1999).
2. Baker NE, Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing for puzzle, *Bioessays* **22**: 264-73 (2000).
3. Baron M, An overview of the Notch signaling pathway, *Seminars in Cell Dev Biol* **14**: 113-119 (2003).
4. Baron M, Aslam H, Flasz M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, Wilkin MB, Multiple level of Notch signal regulation, *Mol Memb Biol* **19**: 27-38 (2002).
5. Bernd J, Preiss A, Wing vein formation in *Drosophila melanogaster*: Hairlaiss is involved in the cross-talk between Notch and EGF signaling pathways, *Mech Dev* **115**: 3-14 (2002).
6. Blair SS, Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase, *Curr Biol* **10**: R608-R612 (2002).
7. Borggrete T, Oswald F, The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes, *Cell Mol Life Sci* **66**: 1631-46 (2009).
8. Bray S, A Notch affair, *Cell* **93**: 499-503 (1998).
9. Bray S, Notch signaling: a simple pathway becomes complex, *Mol Cell Biol* **7**: 678-689 (2006).
10. Deftos M, Bevan MJ, Notch signaling in T cell development, *Curr Opin Immunol* **12**: 166-172 (2000).
11. Frisen J, Lendahl U, Oh no, Notch again, *Bioessays* **23**: 3-7 (2001).
12. Gazave E, Lapébie P, Richards G, Brunet F, Ereskovsky A, Degnan B, Borchellini C, Vervoort M, Renard E, Origin and evolution of the Notch signaling pathway: an overview from eukaryotic genomes, *BMC Evol Biol* **9**: 249 (2009).
13. Gomperts B, Kramer I, Tatham P, *Signal Transduction*, 2nd edition Elsevier (2009).
14. Guidos CJ, Notch signaling in lymphocyte development, *Immunology* **14**: 395-404 (2002).
15. Haines N, Irvine KD, Glycosylation regulates Notch signaling, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 786-797 (2003).
16. Haltiwanger R, Stanley P, Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose- β 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase, *Biochim Biophys Acta* **1573**: 328-335 (2002).
17. Hansson EM., Lendahl U, Chapman G, Notch signaling in development and disease, *Semin Cancer Biol* **14**: 320-328 (2004)
18. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S, Notch signaling at a glance, *J Cell Sci* **126**: 2135-40 (2013).
19. Izon DJ, Aster JC, He Y, Weng A, Karnell FG, Patriub V, Xu L, Bakkour S, Rodriguez C, Allman D, Pear WS, Deltex1 directs lymphoid progenitors to B cell lineage by antagonizing Notch-1, *Immunity* **16**: 231-243. (2002).
20. Izon DJ, Punt JA, Pear WS, Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis, *Curr Opin Immunol* **14**: 192-199 (2002).
21. Joutel A, Tournier-Lasserre E, Notch signaling pathway and human diseases, *Cell Dev Biol* **9**: 619-25 (1998).
22. Justice NJ, Jan YN, Variations on the Notch pathway in neuronal development, *Curr Opin Neurobiol* **12**: 64-70 (2002).
23. Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM, *Νευροεπιστήμες και Συμπεριφορά*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (1999).

24. Kimble J, Henderson S, Crittenden S, Notch/LIN-12 signaling: transduction by regulated protein slicing, *Trends in Biol Sci* **23**: 353-357 (1998).
25. Kojika S, Griffin D, Notch receptors and hematopoiesis, *Exp Hematol* **29**: 1049-52 (2001).
26. Lake J, Grimm LM, Veraksa A, Banos A, Artavanis-Tsakonas S, In Vivo Analysis of the Notch Receptor S1 Cleavage, *PLoS One* **4**: e6728 (2009).
27. Lai E, Notch signaling: control of cell communication and cell fate, *Development* **131**: 995-973 (2004).
28. Lai E, Protein Degradation: Four E3s for the Notch pathway, *Curr Biol* **12**: R74-R78 (2002).
29. Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F, The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling, *Development* **132**: 1751-62 (2005).
30. Louvi A, Artavanis-Tsakonas S, Notch signaling in vertebrate neural development, *Nat Rev Neurosci* **7**: 93-102 (2006).
31. Lundkvist J, Lendahl U, Notch and the birth of glial cells, *Trends Neurochem Sci* **24**: 492-494 (2001).
32. Mello CC, Barrick D, An experimentally determined protein folding energy landscape, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **101**: 14102-107 (2004).
33. Mumm JS, Kopan R, Notch signaling, from the outside in, *Devel Biol* **228**: 151-165 (2000).
34. Nakayama K, Nagase H, Koh CS, Ohkawara T, γ -Secretase-Regulated Signaling and Alzheimer's Disease, Mental and Behavioral Disorders and Diseases of the Nervous System, "Understanding Alzheimer's Disease", book edited by Inga Zerr, Chapter 4 (2013).
35. Pires-daSilva A, Sommer RJ, The evolution of signaling pathways in animal development, *Nat Rev Genet*, **4**: 39-49 (2003).
36. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F, Regulation of innate and adaptive immunity by Notch, *Nat Rev Immunol* **13**: 427-437 (2013).
37. Rana NA, Haltiwanger RS, Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors, *Curr Opin Struct Biol* **21**: 583-589 (2011).
38. Ranganathan P, Weave K, Capobianco A, Notch signaling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time, *Nat Rev Cancer* **11**: 338-351 (2011).
39. Roitt I, Brostoff J, Male D, Ανοσολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, σελ. 426 (2000).
40. Sprinzak D, Lakhmanpal A, LeBon L, Santat LA, Fontes ME, Anderson GA, Garcia-Ojalvo J, Elowitz MB, Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signaling states, *Nature* **465**: 86-90 (2010).
41. Stephenson NL, Avis JM, Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **109**: E2757-65 (2012).
42. Vander MD, Sherman PD, Luciano PD, Τσακόπουλος Μ, Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. 8η Έκδοσ. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Γελαδός Ν, Τσακόπουλος Μ, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης (2001).
43. von Boehmer H, Notch in lymphopoiesis and T cell polarization, *Nat Immunol* **6**: 641-642 (2005).
44. Weinmaster G, Notch signal transduction: a real rip and more, *Curr Opin Genet Dev* **10**: 363-9 (2000).
45. Yeh E, Dermer M, Commisso C, Zhou L, McGlade CJ, Boulianne GL, Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during Drosophila development, *Curr Biol* **11**: 1675-79 (2001).