

Κεφάλαιο 23

Η ρύθμιση της δομής της χρωματίνης

23.1	Εισαγωγή	23.14	Οι πρωτεΐνες που τροποποιούν τη χρωματίνη έχουν ορισμένα κοινά μοτίβα
23.2	Η χρωματίνη μπορεί να βρίσκεται σε εναλλακτικές καταστάσεις	23.15	Ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις ειδικών πρωτεϊνών με τις ιστόνες
23.3	Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι μια ενεργή διαδικασία	23.16	Οι Polcomb και Trithorax είναι ανταγωνιστικοί καταστολείς και ενεργοποιητές
23.4	Στους υποκινητές η οργάνωση των νουκλεοσωμάτων μπορεί να είναι διαφορετική	23.17	Τα χρωμοσώματα Χ υφίστανται τροποποιήσεις σε όλη την έκτασή τους
23.5	Οι τροποποιήσεις των ιστονών και ο ιστονικός κώδικας	23.18	Η χρωμοσωμική συμπύκνωση προκαλείται από τις κοντενσίνες
23.6	Η ακετυλίωση ιστονών συμβαίνει σε δύο περιπτώσεις	23.19	Η μεθυλίωση του DNA διαιωνίζεται μέσω μιας μεθυλάσης διατήρησης
23.7	Οι ακετυλάσες συνδέονται με ενεργοποιητές	23.20	Η μεθυλίωση του DNA ευθύνεται για το εντύπωμα
23.8	Οι απακετυλάσες συνδέονται με καταστολείς	23.21	Γονίδια με αντίθετο εντύπωμα μπορεί να ελέγχονται από το ίδιο κέντρο
23.9	Η μεθυλίωση των ιστονών σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA	23.22	Ορισμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά κληρονομούνται
23.10	Οι τροποποιήσεις των ιστονών μεταβάλλουν αντιστρεπτά την κατάσταση της χρωματίνης	23.23	Τα πρωτεόνια της ζύμης εμφανίζουν ασυνήθιστη κληρονομικότητα
23.11	Η ενεργοποίηση του υποκινητή περιλαμβάνει πολλά στάδια	23.24	Τα πρωτεόνια προκαλούν ασθένειες στα θηλαστικά
23.12	Η φωσφορυλίωση των ιστονών επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης	23.25	Περίληψη
23.13	Η ετεροχρωματίνη εξαπλώνεται από ένα κέντρο		

23.1 Εισαγωγή

Όταν θεωρούμε τη μεταγραφή ως το αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων του DNA με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και RNA πολυμεράσες, περιγράφουμε με αρκετή ακρίβεια τα γεγονότα που συμβαίνουν *in vitro*, χωρίς όμως να λαμβάνουμε υπόψη μία σημαντική παράμετρο της μεταγραφής *in vivo*. Το κυτταρικό γονιδίωμα οργανώνεται σε νουκλεοσώματα, εντούτοις το πακετάρισμα της περιοχής του υποκινητή μπορεί να παρεμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής. Κατ' αυτήν την έννοια, οι ιστόνες λειτουργούν ως γενικοί καταστολείς της μεταγραφής (μια μάλλον αναχρονιστική αντίληψη), αν και σε αυτό το Κεφάλαιο θα δούμε ότι εμπλέκονται και σε πιο ειδικές αλληλεπιδράσεις. Η ενεργοποίηση ενός γονιδίου προϋποθέτει αλλαγές στη δομή της χρωματίνης: το επίμαχο ζήτημα είναι πώς οι μεταγραφικοί παράγοντες αποκτούν πρόσβαση στο DNA του υποκινητή.

Η δομή της χρωματίνης σε ρυθμιστικές περιοχές αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο του μηχανισμού ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η δομή ενός γονιδίου μπορεί να είναι εναλλακτικά είτε σε «ενεργή» είτε σε «ανενεργή» κατάσταση. Η ενεργή κατάσταση εμφανίζεται μόνο στα κύτταρα όπου το γονίδιο εκφράζεται. Η αλλαγή της δομής

προηγείται της έναρξης της μεταγραφής και υποδεικνύει ότι το γονίδιο είναι σε θέση να μεταγράφεται. Αυτό υποδηλώνει ότι η μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή δομή θα πρέπει να αποτελεί το πρώτο βήμα της γονιδιακής έκφρασης. Τα ενεργά γονίδια εντοπίζονται σε επικράτειες της ευχρωματίνης που παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε νουκλεάσες (βλ. 20.15: *Οι επικράτειες καθορίζουν τις περιοχές με ενεργά γονίδια*). Αυτές οι υπερευαίσθητες θέσεις δημιουργούνται στον υποκινητή πριν από την ενεργοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου (βλ. 20.14: *Οι θέσεις υπερευαίσθησίας σε πέψη με DNAάση έχουν παραλλαγμένη δομή*).

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι υπάρχει στενή και διαρκής σχέση ανάμεσα στην κατάσταση της δομής της χρωματίνης και στην έναρξη της μεταγραφής. Ορισμένοι ενεργοποιητές της γονιδιακής μεταγραφής τροποποιούν άμεσα τις ιστόνες. Για παράδειγμα, η ακετυλίωση των ιστονών είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση των γονιδίων. Αντίστροφα, ορισμένοι καταστολείς της μεταγραφής λειτουργούν απακετυλιώνοντας τις ιστόνες. Επομένως η αντιστρεπτή μετατροπή της δομής της χρωματίνης στην περιοχή ενός υποκινητή ενέχεται άμεσα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, ενδεχομένως συμμετέχοντας στο μηχανισμό που διατηρεί το γονίδιο στην ενεργή ή στην ανενεργή κατάσταση.

Οι μηχανισμοί που διατηρούν μια περιοχή της χρωματίνης ανενεργή (σιωπηλή) σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία καταστολής οποιουδήποτε μεμονωμένου υποκινητή. Οι πρωτεΐνες που ενέχονται στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης επιδρούν στη χρωματίνη μέσω των ιστονών, οι τροποποιήσεις των οποίων φαίνεται να είναι σημαντικές γι' αυτού του είδους τις αλληλεπιδράσεις. Αφού εδραιωθούν, οι αλλαγές αυτές μπορούν να διαιωνιστούν διαμέσου των κυτταρικών διαιρέσεων, διατηρώντας μια κατάσταση με **επιγενετικό** (epigenetic) τρόπο, κατά τον οποίο οι ιδιότητες ενός γονιδίου καθορίζονται από την αυτο-αναπαραγόμενη δομή της χρωματίνης. Ο όρος «επιγενετική» αναφέρεται στην ενεργή ή ανενεργή κατάσταση ενός γονιδίου, η οποία είναι μεν κληρονομούμενη, αλλά δεν εξαρτάται από την αλληλουχία του DNA. Ένα άλλο παράδειγμα επιγενετικού φαινομένου αφορά τις αυτο-αναπαραγόμενες δομές των **πρωτεονίων** (prions, πρωτεϊνικοί μολυσματικοί παράγοντες).

23.2 Η χρωματίνη μπορεί να βρίσκεται σε εναλλακτικές καταστάσεις

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η δομή της χρωματίνης είναι σταθερή και δεν μπορεί να αλλάξει μεταβάλλοντας τη σχετική συγκέντρωση μεταγραφικών παραγόντων και ιστονών.

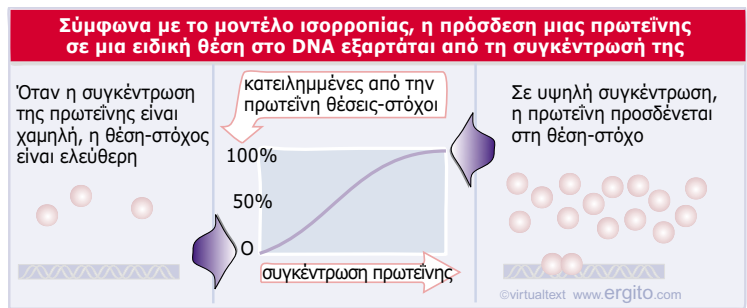
Έχουν προταθεί δύο μοντέλα για τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται η κατάσταση της γονιδιακής έκφρασης: α) το μοντέλο ισορροπίας (equilibrium) και β) το μοντέλο ασυνεχούς αλλαγής κατάστασης (discontinuous change-of-state).

Στην **Εικόνα 23.1** παρουσιάζεται το μοντέλο της ισορροπίας. Στην περίπτωση αυτή, ο μοναδικός παράγοντας που ευθύνεται για τη μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση ενός γονιδίου είναι η συγκέντρωση του καταστολέα ή του ενεργοποιητή, η οποία καθορίζει το σημείο ισορροπίας ανάμεσα στην ελεύθερη και την προσδεσμένη στο DNA μορφή του. Όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι αρκετά υψηλή, καταλαμβάνονται όλες οι θέσεις πρόσδεσης στο DNA, επηρεάζοντας την κατάσταση έκφρασης του γονιδίου. Η πρόσδεση μπορεί είτε να καταστέλλει είτε να ενεργοποιεί μια αλληλουχία-στόχο. Το μοντέλο αυτό ερμηνεύει τη ρύθμιση της μεταγραφής στα βακτηριακά κύτταρα, όπου η γονιδιακή έκφραση καθορίζεται αποκλειστικά από τη δράση μεμονομένων καταστολέων ή ενεργοποιητών, ανάλογα με την περίπτωση (βλ. 10: *Το σπερόνιο*). Είναι δυνατόν να προβλεφθεί αν ένα βακτηριακό γονίδιο μεταγράφεται από τις σχετικές συγκεντρώσεις των ειδικών παραγόντων που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφρασή του. Οι μεταβολές των σχετικών συγκεντρώσεων *ανά πάσα στιγμή* επηρεάζουν ανάλογα την έκφραση του γονιδίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρόσδεση των πρωτεϊνών γίνεται με συνέργεια, έτσι ώστε, όταν η συγκέντρωσή τους γίνεται αρκετά υψηλή, να συνδέονται γρήγορα με το DNA προκαλώντας μεταβολή στη γονιδιακή έκφραση.

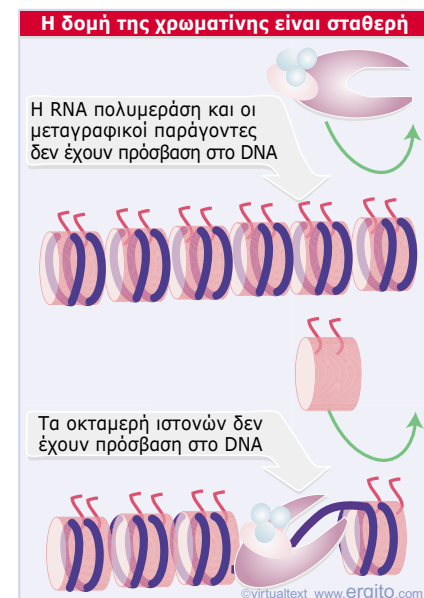
Στην περίπτωση της χρωματίνης του ευκαρυωτικού κυττάρου η κατάσταση είναι διαφορετική. Τα πρώτα πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η ενεργή ή η ανενεργή κατάσταση μπορεί να καθιερωθεί, χωρίς να επηρεάζεται στη συνέχεια από την προσθήκη άλλων παραγόντων. Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας TF_{III}A –που απαιτείται από την RNA πολυμεράση III για τη μεταγραφή των γονιδίων 5S rRNA– δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους *in vitro*, εάν αυτά είναι συνδεδεμένα με ιστόνες. Ωστόσο, αν ο παράγοντας σχηματίζει ένα μεταγραφικό σύμπλοκο με το ελεύθερο DNA του υποκινητή, τότε μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου, χωρίς να επηρεάζεται από τη μετέπειτα προσθήκη ιστονών. Από τη στιγμή που ο παράγοντας καταλάβει τη θέση πρόσδεσής του, παραμένει σε αυτήν επιτρέποντας σε διαδοχικά μόρια RNA πολυμεράσης να αρχίσουν τη μεταγραφή. Επομένως το ποιος παράγοντας, δηλαδή ο μεταγραφικός παράγοντας ή οι ιστόνες, καταλαμβάνει πρώτος τη θέση ελέγχου φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας.

Στην **Εικόνα 23.2** παρουσιάζονται οι δύο διαμορφώσεις στις οποίες μπορεί να βρεθεί ένας ευκαρυωτικός υποκινητής. Στην ανενεργή διαμόρφωση, η παρουσία νουκλεοσωμάτων παρεμποδίζει την πρόσδεση βασικών παραγόντων και RNA πολυμεράσης. Στην ενεργή διαμόρφωση, η βασική συσκευή καταλαμβάνει τον υποκινητή, οπότε τα οκταμερή των ιστονών δεν μπορούν να προσδεθούν σε αυτόν. Και οι δύο διαμορφώσεις είναι σταθερές.

Παρόμοια είναι η περίπτωση του συμπλόκου TF_{II}D, το οποίο συγκροτείται στους υποκινητές της RNA πολυμεράσης II. Ένα πλασμίδιο που φέρει έναν αδενοϊκό υποκινητή μπορεί να μεταγραφεί *in vitro* από την RNA πολυμεράση II, με μια αντίδραση που απαιτεί TF_{II}D και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η μήτρα μπορεί να συναρμολο-



Εικόνα 23.1 Σύμφωνα με το μοντέλο ισορροπίας, η κατάληψη ή όχι μιας θέσης πρόσδεσης στο DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που προσδένεται σ' αυτήν.

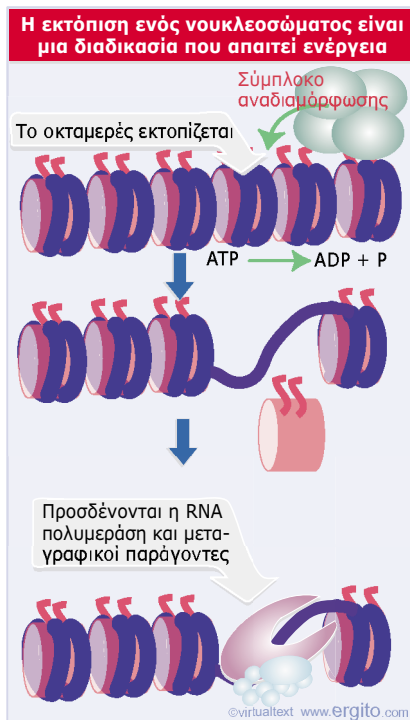


Εικόνα 23.2 Εάν σε έναν υποκινητή σχηματιστούν νουκλεοσώματα, οι μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση δεν μπορούν να προσδεθούν σ' αυτόν. Αντίθετα, εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση προσδεθούν πρώτοι στον υποκινητή και καθιερώσουν ένα σταθερό σύμπλοκο έναρξης, τότε η πρόσδεση των ιστονών δεν είναι δυνατή.

γηθεί σε νουκλεοσώματα με την προσθήκη ιστονών. Εάν οι ιστόνες προστεθούν *πριν* από τον παράγοντα TF_{II}D, δεν είναι δυνατή η έναρξη της μεταγραφής. Εάν όμως ο TF_{II}D προστεθεί πρώτος, η μήτρα εξακολουθεί να μεταγράφεται, παρόλο που έχει μορφή χρωματίνης. Επομένως ο TF_{II}D μπορεί να αναγνωρίζει ελεύθερο DNA, αλλά είτε δεν μπορεί να αναγνωρίσει νουκλεοσωμικό DNA είτε δεν μπορεί να λειτουργήσει πάνω σε αυτό. Αρκεί η προσθήκη μόνο του TF_{II}D πριν από τις ιστόνες: οι υπόλοιποι μεταγραφικοί παράγοντες, καθώς και η RNA πολυμεράση, μπορούν να προστεθούν αργότερα. Αυτό υπονοεί ότι η πρόσδεση του TF_{II}D στον υποκινητή δημιουργεί μια δομή στην οποία μπορούν να προσδεθούν τα υπόλοιπα συστατικά της μεταγραφικής συσκευής.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τέτοια συστήματα *in vitro* χρησιμοποιούν δυσανάλογες ποσότητες συστατικών, οπότε είναι πιθανόν να αποκλίνουν σημαντικά από τις φυσιολογικές συνθήκες. Συνεπώς η μεγάλη σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν είναι ότι περιγράφουν το μηχανισμό που χρησιμοποιείται *in vivo* αλλά ότι καθιερώνουν την αρχή σύμφωνα με την οποία οι μεταγραφικοί παράγοντες ή τα νουκλεοσώματα μπορούν να δημιουργούν σταθερές δομές με το DNA, οι οποίες δεν μπορούν να αλλάξουν μεταβάλλοντας απλώς την ισορροπία τους με τα ελεύθερα συστατικά.

23.3 Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι μια ενεργή διαδικασία



Εικόνα 23.3 Το δυναμικό μοντέλο για τη μεταγραφή της χρωματίνης προβλέπει τη δράση παραγόντων οι οποίοι χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP για να εκτοπίσουν τα νουκλεοσώματα από συγκεκριμένες περιοχές του DNA.

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Υπάρχουν διάφορα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τα οποία χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP.
- ▶ Τα σύμπλοκα SWI/SNF, RSC και NURF έχουν πολύ μεγάλη μάζα και μερικές από τις υπομονάδες τους είναι κοινές σε διάφορα σύμπλοκα.
- ▶ Ένα σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης δεν εμφανίζει από μόνο του ειδικότητα για συγκεκριμένες θέσεις-στόχους, αλλά πρέπει να στρατολογηθεί σε αυτές από ένα συστατικό της μεταγραφικής συσκευής.

Η διαδικασία επαγωγής αλλαγών στη δομή της χρωματίνης ονομάζεται **αναδιαμόρφωση της χρωματίνης** (chromatin remodeling) και περιλαμβάνει μηχανισμούς εκτόπισης των ιστονών, οι οποίοι απαιτούν κατανάλωση ενέργειας. Προκειμένου να απελευθερωθούν οι ιστόνες από τη χρωματίνη, χρειάζεται να διασπαστούν πολυάριθμες επαφές μεταξύ πρωτεϊνών και μεταξύ πρωτεϊνών και DNA. Η διαδικασία αυτή έχει σημαντικό κόστος για το κύτταρο, μια και η διάσπαση των επαφών απαιτεί ενέργεια. Στην **Εικόνα 23.3** περιγράφεται η αρχή ενός **δυναμικού μοντέλου** (dynamic model), το οποίο προβλέπει τη δράση ενός παράγοντα που υδρολύει ATP. Όταν το οκταμερές των ιστονών απελευθερώνεται από το DNA, άλλες πρωτεΐνες (σε αυτή την περίπτωση, οι μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση) μπορούν να προσδεθούν σε αυτό.

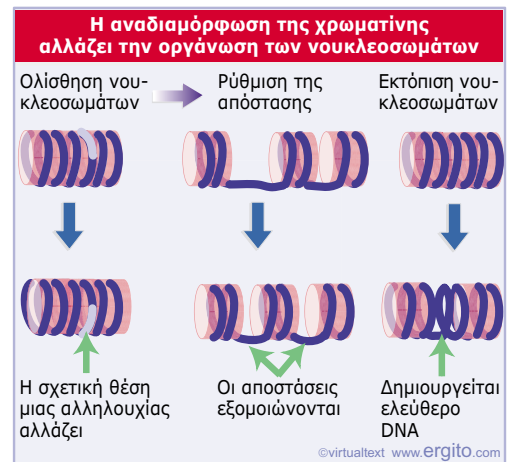
Στην **Εικόνα 23.4** συνοψίζονται οι τύποι αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που έχουν χαρακτηριστεί *in vitro*:

- ▶ Τα οκταμερή των ιστονών μπορούν να ολισθήσουν κατά μήκος του DNA, αλλάζοντας τη σχετική θέση πρωτεΐνης και νουκλεϊκού οξέος. Έτσι, μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία μπορεί να μετατοπιστεί πάνω στην επιφάνεια των νουκλεοσωμάτων.
- ▶ Η απόσταση (spacing) ανάμεσα σε διαδοχικά οκταμερή ιστονών μπορεί να μεταβληθεί, με συνέπεια και πάλι την αλλαγή της θέσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε σχέση με το νουκλεόσωμα.
- ▶ Η πιο εκτεταμένη αλλαγή είναι η ολοκληρωτική εκτόπιση και απομάκρυνση ενός ή περισσότερων οκταμερών ιστονών από το DNA και η δημιουργία χάσματος στη συνεχή χρωματινική δομή, δηλαδή ο σχηματισμός μιας περιοχής όπου το νουκλεϊκό οξύ είναι ελεύθερο από νουκλεοσώματα.

Η πιο προφανής εφαρμογή της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι η αλλαγή της οργάνωσης των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή ενός γονιδίου που πρόκειται να μεταγραφεί, ώστε να επιτραπεί η πρόσβαση της μεταγραφικής συσκευής στον υποκινητή. Η αναδιαμόρφωση πιο συχνά περιλαμβάνει εκτόπιση ενός ή περισσότερων οκταμερών ιστονών. Η εκτόπιση μπορεί να γίνει αντιληπτή από την αλλαγή στο πρότυπο πέψης με μικροκοκκική νουκλεάση, αφού το ένζυμο κόβει το DNA στις θέσεις όπου δεν παρέχεται πλέον προστασία από τις ιστόνες. Επιπλέον, συνήθως δημιουργείται μια θέση που είναι υπερευαίσθητη στην DNAάση I (βλ. 20.14: *Οι θέσεις υπερευαίσθησίας σε πέψη με DNAάση έχουν παραλλαγμένη δομή*). Μερικές φορές συμβαίνουν λιγότερο δραματικές αλλαγές, για παράδειγμα μια στροφική αλλαγή στη διάταξη ενός μόνο νουκλεοσώματος. Αυτή η αλλαγή μπορεί να ανιχνευθεί από την απώλεια της χαρακτηριστικής κλίμακας 10 βάσεων της DNAάσης I (DNAase I 10 base ladder). Παρατηρείται, επομένως, ένα ευρύ φάσμα μεταβολών στη δομή της χρωματίνης, που κυμαίνεται από απλή μετακίνηση των νουκλεοσωμάτων έως την ολοκληρωτική απομάκρυνσή τους από το DNA.

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης διενεργείται από μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών που υδρολύουν ATP για να παραγάγουν την απαιτούμενη ενέργεια. Ο πυρήνας του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης είναι η υπομονάδα που φέρει την καταλυτική ενεργότητα της ATPάσης. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης συνήθως ταξινομούνται βάσει του τύπου της υπομονάδας ATPάσης που περιέχουν – όσα έχουν συγγενικές υπομονάδες ATPάσης θεωρούνται ότι ανήκουν στην ίδια οικογένεια (συνήθως έχουν κοινές και ορισμένες άλλες υπομονάδες). Στην **Εικόνα 23.5** εφαρμόζεται αυτός ο τρόπος ταξινόμησης. Οι δύο κύριοι τύποι συμπλόκων είναι το SWI/SNF και το ISW [ISW σημαίνει απομίμηση (imitation) του SWI]. Η ζύμη έχει δύο σύμπλοκα από κάθε τύπο. Σύμπλοκα και των δύο τύπων απαντώνται επίσης στη μύγα και στον άνθρωπο. Καθένα σύμπλοκο είναι υπεύθυνο για διαφορετικό ρεπερτόριο διαδικασιών αναδιαμόρφωσης.

Το **SWI/SNF** ήταν το πρώτο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που αναγνωρίστηκε. Το όνομά του αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι πολλές από τις υπομονάδες του κωδικοποιούνται από γονίδια που αρχικά ταυτοποιήθηκαν από τις μεταλλάξεις *SWI* (**s**witch, αλλαγή συζευκτικού τύπου) και *SNF* (**S**ucose **N**on **F**ermenting, ελαττωματική ζύμωση της σακχαρόζης) στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Οι μεταλλά-



Εικόνα 23.4 Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης μπορούν να προωθήσουν την ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων κατά μήκος του DNA, να εκτοπίσουν ολοκληρωτικά τα νουκλεοσώματα από το DNA ή να αλλάξουν την απόσταση διαδοχικών νουκλεοσωμάτων.

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι συμπλόκων αναδιαμόρφωσης			
Τύπος συμπλόκου	SWI/SNF	ISW	Άλλος
Ζύμη	SWI/SNF RSC	ISW1 ISW2	
Μύγα	dSWI/SNF (Brahma)	NURF CHRAC ACF	
Άνθρωπος	hSWI/SNF	RSF hACF/WCRF hCHRAC	NuRD
Βάτραχος			Mi-2

©virtualtext www.ergito.com

Εικόνα 23.5 Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με την υπομονάδα ATPάσης που περιλαμβάνουν.

Ξεις αυτών των γενετικών τόπων είναι πλειοτροπικές και το φάσμα των φαινοτυπικών ελαττωμάτων που προκαλούν είναι παρόμοιο με εκείνο που εμφανίζουν μεταλλάγματα της RNA πολυμεράσης II χωρίς ουρά CTD. Επίσης, οι ίδιες μεταλλάξεις εμφανίζουν γενετική αλληλεπίδραση (δηλαδή καταστέλλονται) με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν συστατικά της χρωματίνης, όπως το *SIN1* (**S**wi **I**ndependent, ανεξάρτητο από τη μετάλλαξη Swi), που κωδικοποιεί μια μη ιστονική πρωτεΐνη, και το *SIN2*, που κωδικοποιεί την ιστόνη H3. Τα γονίδια *SWI* και *SNF* είναι απαραίτητα για την έκφραση μιας ποικιλίας γενετικών τόπων (επηρεάζονται ~120 γονίδια, δηλαδή το 2% των γονιδίων του *S. cerevisiae*). Για την έκφραση αυτών των γενετικών τόπων είναι πιθανόν να χρειάζεται το σύμπλοκο SWI/SNF, ώστε να αναδιαμορφωθεί η χρωματίνη στους υποκινητές τους.

Το SWI/SNF δρα καταλυτικά *in vitro*, ενώ κάθε κύτταρο ζύμης περιέχει μόλις ~150 τέτοια σύμπλοκα. Κανένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του SWI/SNF δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση (non-essential), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ζύμη μπορεί να αναδιαμορφώνει τη χρωματίνη της με διαφορετικούς εναλλακτικούς τρόπους. Πιο σημαντικό είναι το σύμπλοκο RSC, το οποίο υπερσχύει ποσοτικά και είναι απαραίτητο (essential) για την επιβίωση της ζύμης. Το σύμπλοκο αυτό επιδρά σε ~700 γενετικούς τόπους-στόχους.

Το σύμπλοκο SWI/SNF μπορεί να αναδιαμορφώσει τη χρωματίνη *in vitro* χωρίς απώλεια των ιστονών ή να εκτοπίσει τα οκταμερή των ιστονών από το DNA. Και οι δύο αντιδράσεις περιλαμβάνουν ένα κοινό ενδιάμεσο στάδιο, κατά το οποίο η δομή του νουκλεοσώματος-στόχου μεταβάλλεται, οδηγώντας τελικά είτε στο σχηματισμό ενός αναδιαμορφωμένου νουκλεοσώματος που εξακολουθεί να βρίσκεται πάνω στο αρχικό μόριο DNA είτε στη μετατόπιση του οκταμερούς των ιστονών προς ένα διαφορετικό μόριο DNA. Στη θέση-στόχο, το σύμπλοκο SWI/SNF μεταβάλλει την ευαισθησία των νουκλεοσωμικών δομών στη δράση της DNAάσης I, ενώ επάγει αλλαγές σε επαφές μεταξύ πρωτεΐνης και DNA, οι οποίες εξακολουθούν να υφίστανται και μετά την απελευθέρωση του συμπλόκου από τα νουκλεοσώματα. Η υπομονάδα SWI2 είναι η ATPάση, η οποία προσφέρει την ενέργεια που χρειάζεται το σύμπλοκο SWI/SNF για να επιτελέσει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης.

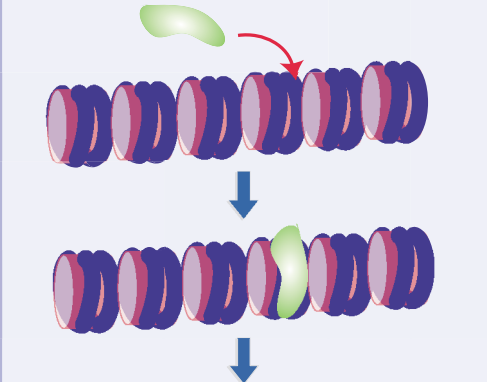
Οι επαφές ανάμεσα στο DNA και σε ένα οκταμερές ιστονών είναι πολυάριθμες, δεδομένου ότι τουλάχιστον 14 έχουν ήδη προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία. Όλες αυτές οι επαφές θα πρέπει να διασπαστούν, προκειμένου ένα οκταμερές να απελευθερωθεί από το DNA ή να μετατοπιστεί σε μια νέα θέση πάνω σε αυτό. Πώς όμως επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο; Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι δε σχηματίζεται μονόκλωνο DNA στην περιοχή που υφίσταται την αναδιαμόρφωση. Η τρέχουσα άποψη είναι ότι τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης SWI και ISWI χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP για να επιτύχουν μια τοπική διόγκωση του DNA πάνω στη νουκλεοσωμική επιφάνεια. Έμμεσες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι κατά τη διόγκωση αυτή αναπτύσσεται μηχανική δύναμη που επιτρέπει σε μια μικρή περιοχή του DNA να αποδεσμευτεί από την επιφάνεια του νουκλεοσώματος και να επανατοποθετηθεί πάνω σε αυτή.

Μια σημαντική αντίδραση που καταλύεται από τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης αφορά τη λεγόμενη νουκλεοσωμική ολίσθηση (nucleosome sliding). Αρχικά είχε παρατηρηθεί ότι η οικογένεια ISWI είναι σε θέση να επηρεάζει τη νουκλεοσωμική διάταξη, χωρίς ωστόσο να εκτοπίζει τα οκταμερή των ιστονών από το DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει ολίσθηση του οκταμερούς κατά μήκος του DNA. Η μετακίνηση αυτή παρεμποδίζεται εάν αφαιρεθεί η Ν-τελική ουρά της ιστόνης H4, αν και δεν είναι ακόμη γνωστός ο ρόλος της δομής αυτής στην όλη διαδικασία. Τα σύμπλοκα SWI/SNF έχουν παρόμοια καταλυτική ικανότητα: η αντίδραση μπορεί να παρεμποδιστεί με την εισαγωγή ενός μηχανικού εμποδίου πάνω στο DNA, γεγονός που υποδεικνύει ότι το οκταμερές των ιστονών πράγματι είναι σε θέση να μετακινείται με μάλλον συνεχή τρόπο κατά μήκος του DNA, χωρίς ποτέ να χάνει την επαφή μαζί του.

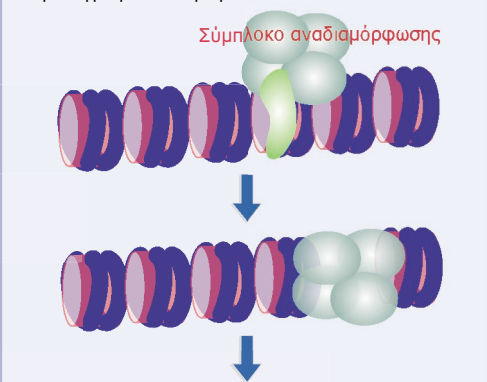
Το τεράστιο μέγεθος του συμπλόκου SWI/SNF δημιουργεί προβληματισμό σχετικά με το μηχανισμό δράσης του. Αποτελείται από 11 υπομονάδες με συνολικό μοριακό βάρος $\sim 2 \times 10^6$. Το μέγεθός του είναι γιγαντιαίο σε σχέση με αυτό της RNA πολυμεράσης και του νουκλεοσώματος, προκαλώντας απορία για το πώς είναι δυνατό όλα αυτά τα συστατικά να αλληλεπιδρούν με το DNA πάνω στη νουκλεοσωμική επιφάνεια. Ωστόσο, το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης II, δηλαδή το μεταγραφικό σύμπλοκο στην πλήρως ενεργή μορφή του, είναι ακόμη πιο ογκώδες, μια και περιέχει τόσο την ίδια την RNA πολυμεράση όσο και όλους τους μεταγραφικούς παράγοντες TF_{II} (εκτός των TBP και TF_{II}A), καθώς και το σύμπλοκο SWI/SNF, το οποίο συνδέεται με την ουρά CTD της πολυμεράσης. Πράγματι, κυριολεκτικά όλα τα συστατικά του συμπλόκου SWI/SNF μπορούν να βρεθούν σε παρασκευάσματα του ολοενζύμου. Αυτό υποδηλώνει ότι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η αναγνώριση των υποκινητών είναι διαδικασίες που διεξάγονται με συντονισμένο τρόπο από ένα μόνο μεταγραφικό σύμπλοκο.

Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης προσδένονται στη χρωματίνη μέσω μεταγραφικών παραγόντων

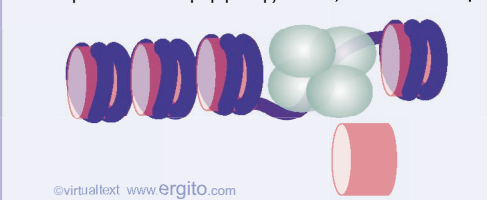
1. Ένας μεταγραφικός παράγοντας αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία και προσδένεται στο DNA



2. Το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης προσδένεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα



3. Το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης εκτοπίζει το νουκλεόσωμα



©virtualtext www.ergito.com

Εικόνα 23.6 Ένα σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης προσδένεται στη χρωματίνη μέσω ενός ενεργοποιητή ή ενός καταστολέα.

23.4 Στους υποκινητές η οργάνωση των νουκλεοσωμάτων μπορεί να είναι διαφορετική

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης στρατολογούνται στους υποκινητές από ενεργοποιητές που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του DNA.
- ▶ Ο ενεργοποιητής μπορεί να απελευθερωθεί μετά την πρόσδεση του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης.
- ▶ Ο υποκινητής MMTV απαιτεί μια αλλαγή στη στροφική διάταξη ενός νουκλεοσώματος, έτσι ώστε να επιτραπεί η πρόσδεση ενός ενεργοποιητή σε αυτό.

Πώς τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης στοχεύουν συγκεκριμένες θέσεις της χρωματίνης; Τα ίδια τα σύμπλοκα δε φέρουν υπομονάδες ικανές να αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του DNA. Επομένως είναι πιθανόν να ισχύει το μοντέλο της **Εικόνας 23.6**, σύμφωνα με το οποίο τα σύμπλοκα στρατολογούνται στις ειδικές θέσεις από ενεργοποιητές ή (μερικές φορές) από καταστολείς της μεταγραφής.

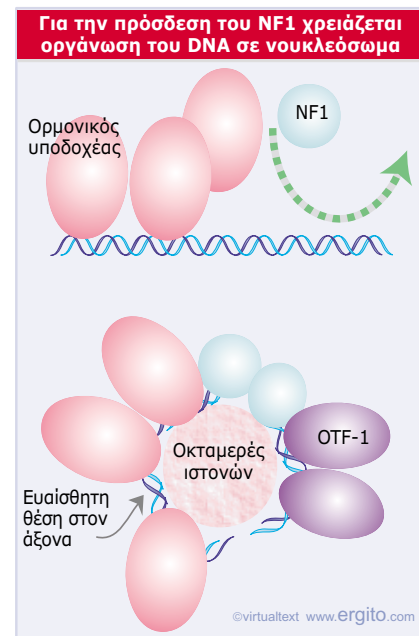
Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων με τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης αποτελεί το κλειδί για την κατανόηση της λειτουργίας τους. Στη ζύμη, ο μεταγραφικός παράγοντας Swi5p ενεργοποιεί το γενετικό τόπο *HO* (διευκρινίζεται ότι ο Swi5p δεν περιλαμβάνεται στο σύμπλοκο SWI/SNF). Ο Swi5p εισέρχεται στον πυρήνα κατά το τέλος της μίτωσης και προσδένεται στον υποκινητή *HO*, όπου στρατολογεί το σύμπλοκο SWI/SNF. Στη συνέχεια, ο Swi5p απελευθερώνεται, αφήνοντας το SWI/SNF πάνω στον υποκινητή. Αυτό σημαίνει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να ενεργοποιήσει έναν υποκινητή με ένα μηχανισμό «δράσης-απομάκρυνσης» («hit and run»).

Η συμμετοχή των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης στην ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης ανακαλύφθηκε όταν παρατηρήθηκε ότι ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες χρειάζονται τα σύμπλοκα αυτά προκειμένου να επιδράσουν στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων τους. Ένα από τα πρώτα παραδείγματα αποτέλεσε ο παράγοντας GAGA, ο οποίος ενεργοποιεί *in vitro* τον υποκινητή *hsp70* της *Drosophila*. Η πρόσδεση του GAGA σε τέσσερις θέσεις πλούσιες σε (CT)_n του υποκινητή οδηγεί σε αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων, δημιουργία μιας υπερευαίσθητης στην DNAάση I θέσης και αναδιάταξη των παρακείμενων νουκλεοσωμάτων, ώστε να καταλαμβάνουν επιλεγμένες και όχι τυχαίες θέσεις. Η αναδιάταξη είναι μια δαπανηρή ενεργειακή διαδικασία που απαιτεί το σύμπλοκο NURF (**N**ucleosome **R**emodeling **F**actor, παράγοντας αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων). Η οργάνωση των παρακείμενων νουκλεοσωμάτων αλλάζει, έτσι ώστε αυτά να μην μπορούν πλέον να πλησιάσουν τον υποκινητή πέρα από κάποια καθορισμένα όρια. Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ο GAGA προσδένεται στις θέσεις-στόχους του πάνω στο DNA και η παρουσία του σταθεροποιεί τη χρωματίνη στην αναδιαμορφωμένη κατάστασή της.

Το σύστημα *PHO* ήταν ένα από τα πρώτα για τα οποία αποδείχθηκε ότι η γονιδιακή ενεργοποίηση προϋποθέτει αλλαγή της νουκλεοσωμικής οργάνωσης. Στον υποκινητή *PHO5*, ο ρυθμιστής *PHO4*, που έχει δομή bHLH, αποκρίνεται στην έλλειψη φωσφορικών ιόντων επάγοντας την αποδιάταξη τεσσάρων νουκλεοσωμάτων τα οποία κατείχαν επακριβώς καθορισμένες θέσεις στη χρωματίνη. Το φαινόμενο αυτό είναι ανεξάρτητο τόσο από τη μεταγραφή, μια και συμβαίνει ακόμη και σε μεταλλάγματα TATA⁻, όσο και από την αντιγραφή. Υπάρχουν δύο θέσεις πρόσδεσης του *PHO4* στον υποκινητή: η μία βρίσκεται ανάμεσα στα νουκλεοσώματα και μπορεί να αναγνωριστεί από την επικράτεια του *PHO4* που προσδένεται στο DNA, ενώ η άλλη καλύπτεται από ένα νουκλεόσωμα και δεν μπορεί να αναγνωριστεί. Προκειμένου να επιτραπεί η πρόσδεση του *PHO4* στη δεύτερη θέση και να ενεργοποιηθεί η γονιδιακή έκφραση, είναι απαραίτητη η αποδιάταξη του νουκλεοσώματος. Το συγκεκριμένο βήμα απαιτεί την παρουσία μιας επικράτειας ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η αλληλουχία ενεργοποίησης του VP16 μπορεί να αντικαταστήσει την αλληλουχία ενεργοποίησης του *PHO4* κατά τη νουκλεοσωμική αποδιάταξη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αποδιάταξη γίνεται μέσω επαφών πρωτεΐνης με πρωτεΐνη πάνω στην ίδια περιοχή, στην οποία δημιουργούνται οι αντίστοιχες επαφές που ενεργοποιούν τη μεταγραφή. Σε αυτή την περίπτωση, δεν είναι γνωστό ποιο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης εκτελεί τις συγκεκριμένες διεργασίες.

Ωστόσο, δεν είναι πάντοτε απαραίτητο να απομακρυνθούν τα νουκλεοσώματα προκειμένου να επιτραπεί η έναρξη της μεταγραφής. Μερικοί ενεργοποιητές μπορούν να προσδεθούν στο DNA που βρίσκεται στην επιφάνεια ενός νουκλεοσώματος. Σε ορισμένα στοιχεία απόκρισης σε στεροειδείς ορμόνες, τα νουκλεοσώματα φαίνεται να είναι επακριβώς διατεταγμένα, έτσι ώστε να επιτρέπεται η πρόσδεση των υποδοχέων στην αλληλουχία-στόχο. Η πρόσδεση των υποδοχέων είναι δυνατόν να επηρεάζει την αλληλεπίδραση του DNA με τις ιστόνες, οδηγώντας στην παρουσίαση επιπλέον θέσεων πρόσδεσης του υποδοχέα στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος. Η ακριβής διάταξη των νουκλεοσωμάτων ίσως να είναι απαραίτητη είτε για να «εκτίθεται» το DNA καθώς βρίσκεται περιελιγμένο κατά ένα συγκεκριμένο τρόπο γύρω από το νουκλεόσωμα είτε για να επιτρέπει αλληλεπιδράσεις των ενεργοποιητών με τις ιστόνες ή με άλλα συστατικά της χρωματίνης. Με βάση το σκεπτικό αυτό, έχουμε πλέον προχωρήσει από τη στενή αντίληψη ότι η χρωματίνη αποτελεί μια αποκλειστικά κατασταλτική δομή στην ευρύτερη αντίληψη ότι απαιτούνται δυναμικές αλληλεπιδράσεις των ενεργοποιητών με τη χρωματίνη προκειμένου να επιτευχθεί η ενεργοποίηση των γονιδίων.

Ο υποκινητής *MMTV* αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα της σημασίας της εξειδικευμένης νουκλεοσωμικής οργάνωσης. Ο υποκινητής φέρει μια σειρά από 3 μερικώς παλινδρομικές θέσεις, καθεμία από τις οποίες συνιστά ένα στοιχείο HRE (**H**ormone **R**esponse **E**lement, στοιχείο απόκρισης στην ορμόνη) όπου προσδένεται ένα διμερές του ορμονικού υποδοχέα (HR, **H**ormone **R**ecceptor). Επίσης, ο υποκινητής περιέχει μία θέση πρόσδεσης του παράγοντα NF1, δίπλα στην οποία βρίσκονται δύο θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα OTF-1. Οι HR και NF1 δεν μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα στις αντίστοιχες θέσεις τους όταν το DNA είναι ελεύθερο ιστονών. Στην **Εικόνα 23.7** παρουσιάζεται πώς η νουκλεοσωμική δομή ελέγχει την πρόσδεση αυτών των παραγόντων.



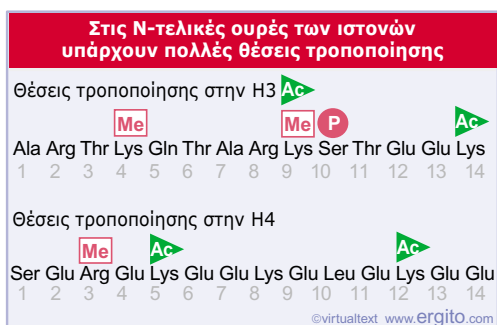
Εικόνα 23.7 Ο ορμονικός υποδοχέας HR και ο παράγοντας NF1 δεν μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα στον υποκινητή MMTV αν αυτός έχει μορφή γραμμικού DNA, αλλά μπορούν να προσδεθούν αν το DNA βρίσκεται στην επιφάνεια ενός νουκλεοσώματος.

Ο HR προστατεύει από πέψη τις θέσεις πρόσδεσής του στον υποκινητή, όταν προστίθεται η ορμόνη, αλλά δεν επηρεάζει τις ευαίσθητες σε μικροκοκκική νουκλεάση θέσεις που αντιστοιχούν στα δύο άκρα του νουκλεοσώματος. Αυτό σημαίνει ότι ο HR προσδένεται σε DNA που βρίσκεται πάνω στη νουκλεοσωμική επιφάνεια. Ωστόσο, πριν την προσθήκη της ορμόνης, το περιελιγμένο γύρω από το νουκλεόσωμα DNA είναι στροφικά διατεταγμένο έτσι ώστε να επιτρέπεται η πρόσβαση των HR και NF1 μόνο σε δύο από τις τέσσερις διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης. Η πρόσδεση στις υπόλοιπες δύο θέσεις απαιτεί αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και αλλαγή της διάταξης του νουκλεοσώματος σε σχέση με την αλληλουχία του DNA που περιελίσσεται γύρω από αυτό. Αυτή η αλλαγή μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της εμφάνισης μιας ευαίσθητης σε νουκλεάση θέσης, η οποία βρίσκεται πάνω στον άξονα δυαδικής συμμετρίας του HRE, που συμπίπτει με την περιοχή ανάμεσα σε δύο από τις τρεις θέσεις πρόσδεσης του διμερούς HR. Ο NF1 μπορεί να ιχνηλατηθεί πάνω στο νουκλεόσωμα κατόπιν επαγωγής από την ορμόνη. Φαίνεται ότι οι παραπάνω δομικές αλλαγές είναι απαραίτητες για την πρόσδεση του NF1, πιθανόν επειδή οδηγούν σε έκθεση του DNA και αναιρούν τη χωρο-παρεμπόδιση (steric hindrance) από τον HR, ο οποίος εμποδίζει την πρόσδεση του NF1 στο ελεύθερο DNA.

23.5 Οι τροποποιήσεις των ιστονών και ο ιστονικός κώδικας

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η N-τελική ουρά των ιστονών H3 και H4 μπορεί να υφίσταται τροποποιήσεις, οι οποίες μπορεί να περιορίζονται σε λίγα μόνο νουκλεοσώματα ή να αφορούν πιο εκτεταμένες χρωματινικές περιοχές ή ακόμη και ολόκληρο το χρωμόσωμα.
- ▶ Η ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 γενικά συναντάται σε περιοχές ενεργής χρωματίνης ενώ η μεθυλίωση σε περιοχές ανενεργής χρωματίνης.



Εικόνα 23.8 Οι N-τελικές ουρές των ιστονών H3 και H4 μπορούν να ακετυλιωθούν, να μεθυλιωθούν ή να φωσφορυλιωθούν σε αρκετές θέσεις.

Η έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από τη δομή της χρωματίνης τόσο τοπικά (στον υποκινητή) όσο και στην παρακείμενη χρωμοσωμική επικράτεια. Αντίστοιχα, η δομή της χρωματίνης μπορεί να ρυθμίζεται είτε μεμονωμένα, από κάποια τοπική ενεργοποίηση, είτε γενικευμένα, από αλλαγές που επηρεάζουν μια εκτεταμένη χρωμοσωμική περιοχή. Τα τοπικά φαινόμενα ρύθμισης αφορούν ένα μεμονωμένο γονίδιο-στόχο, γύρω από τον υποκινητή του οποίου αλλάζει η δομή και η οργάνωση των νουκλεοσωμάτων. Πιο γενικευμένες αλλαγές μπορεί να επηρεάζουν μεγάλες περιοχές της χρωματίνης ή ακόμη κι ολόκληρο το χρωμόσωμα.

Οι αλλαγές που επηρεάζουν εκτεταμένες περιοχές ελέγχουν τη δυνατότητα έκφρασης ενός γονιδίου. Ο όρος «**αποσιώπηση**» (silencing) αναφέρεται στην τοπική καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου εντός μιας χρωμοσωμικής περιοχής. Ο όρος «**ετεροχρωματίνη**» (heterochromatin) περιγράφει συμπυκνωμένες χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες

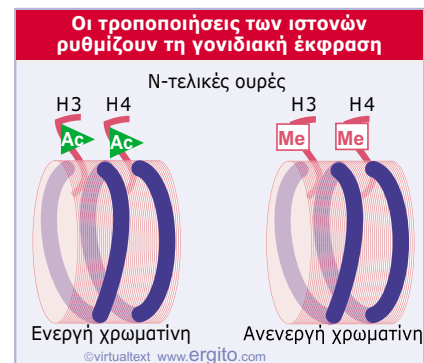
είναι αρκετά μεγάλες, ώστε να έχουν μια χαρακτηριστική συμπαγή δομή που μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Οι δύο αυτές περιπτώσεις έχουν κοινή βάση: συγκεκριμένες πρωτεΐνες προσδένονται στη χρωματίνη και –είτε άμεσα είτε έμμεσα– εμποδίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση να ενεργοποιήσουν τους υποκινητές της περιοχής αυτής.

Οι αλλαγές της χρωματίνης σε ένα μεμονωμένο υποκινητή ελέγχουν την έναρξη της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου. Τέτοιου είδους αλλαγές μπορεί να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στη γονιδιακή έκφραση.

Τα παραπάνω φαινόμενα εξαρτώνται από ειδικές τροποποιήσεις των ιστονών. Οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης απαιτούν τροποποίηση των N-τελικών ουρών των ιστονών, ειδικά των H3 και H4. Η ουρά των ιστονών περιλαμβάνει τα ~20 N-τελικά αμινοξέα και προεκβάλλει από το νουκλεόσωμα, ανάμεσα από τις σπείρες του DNA (βλ. Εικόνα 20.25 και Ενότητα 20.8: *Η οργάνωση του ιστονικού οκταμερούς*). Στην **Εικόνα 23.8** φαίνεται ότι οι ουρές των ιστονών μπορούν να τροποποιηθούν με μεθυλίωση, ακετυλίωση ή φωσφορυλίωση σε διάφορα αμινοξέα (βλ. 20.9: *Οι N-τελικές ουρές των ιστονών υφίστανται χημικές τροποποιήσεις*). Οι τροποποιήσεις επηρεάζουν το ηλεκτρικό φορτίο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι δυνατόν να επηρεάζουν άμεσα τη δομή του νουκλεοσώματος ή να δημιουργούν θέσεις πρόσδεσης για την προσκόλληση μη ιστονικών πρωτεϊνών, οι οποίες αλλάζουν τις ιδιότητες της χρωματίνης.

Η έκταση της χρωματινικής περιοχής που υφίσταται τροποποίηση νουκλεοσωμάτων μπορεί να ποικίλλει. Η τροποποίηση μπορεί να αποτελεί τοπικό γεγονός, για παράδειγμα να περιορίζεται στα νουκλεοσώματα ενός υποκινητή. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι ένα γενικευμένο γεγονός και να εκτείνεται ακόμη και σε ολόκληρο το χρωμόσωμα. Στην **Εικόνα 23.9** φαίνεται ότι η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την ενεργή χρωματίνη, ενώ, αντίθετα, η μεθυλίωση σχετίζεται με την ανενεργή. Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί απαραίτητο κανόνα. Συχνά έχει μεγάλη σημασία ποιες συγκεκριμένες θέσεις ή συνδυασμοί θέσεων τροποποιούνται. Για παράδειγμα, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες μπορεί να βρούμε μεθυλωμένες ιστόνες σε μια ορισμένη θέση στην ενεργή χρωματίνη. Αντίστροφα, οι μεταλλάξεις ενός από τα σύμπλοκα ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών της ζύμης έχουν το αντίθετο από το αναμενόμενο αποτέλεσμα, δηλαδή παρεμποδίζουν την αποσιώπηση ορισμένων γονιδίων. Τέτοιες παρατηρήσεις τονίζουν την αδυναμία διατύπωσης ενός γενικού κανόνα που να περιγράφει όλες τις συνέπειες της ακετυλίωσης και της μεθυλίωσης.

Οι αντιδράσεις τροποποίησης της χρωματίνης είναι εξειδικευμένες, αφού πολλά από τα τροποποιητικά ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικές θέσεις-στόχους πάνω σε συγκεκριμένες ιστόνες. Στην **Εικόνα 23.10** συνοψίζονται οι συνέπειες ορισμένων τέτοιων τροποποιήσεων. Οι περισσότερες θέσεις-στόχοι υπόκεινται σε ένα μόνο τύπο τροποποίησης. Ακόμη, σε ορισμένες περιπτώσεις, η τροποποίηση μιας θέσης είναι δυνατόν να ενεργοποιήσει ή να αναστείλει την τροποποίηση μιας



Εικόνα 23.9 Η ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 σχετίζεται με την ενεργή ενώ η μεθυλίωση με την ανενεργή κατάσταση της χρωματίνης.

Οι τροποποιήσεις των ιστονών επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της χρωματίνης			
Ιστόνη	Θέση	Τροποποίηση	Λειτουργία
H3	Lys-4	μεθυλίωση	Παίζει ρόλο στη συμύκνωση της χρωματίνης και απαιτείται για τη μεθυλίωση του DNA
	Lys-9	μεθυλίωση	
	Lys-9	ακετυλίωση	Εμποδίζει τη μεθυλίωση στη Lys-9
	Ser-10	φωσφορυλίωση	
	Lys-14	ακετυλίωση	
H4	Lys-79	μεθυλίωση	Τελομερική αποσιώπηση
	Arg-3	μεθυλίωση	Συναρμολόγηση νουκλεοσώματος
	Lys-5	ακετυλίωση	
	Lys-12	ακετυλίωση	
	Lys-16	ακετυλίωση	
	Lys-16	ακετυλίωση	Απενεργοποίηση του X στη μύγα

Εικόνα 23.10 Οι περισσότερες θέσεις τροποποίησης των ιστονών υφίστανται ένα μοναδικό, ειδικό τύπο τροποποίησης. Ωστόσο, μερικές άλλες θέσεις μπορεί να αποτελούν στόχους περισσότερων τύπων τροποποίησης. Ορισμένες τροποποιήσεις μπορεί να σχετίζονται με συγκεκριμένες λειτουργίες της χρωματίνης.

άλλης θέσης. Η άποψη ότι μπορεί να χρησιμοποιούνται ποικίλοι συνδυασμοί σημάτων οι οποίοι προσδιορίζουν διαφορετικούς τύπους χρωματίνης περιγράφεται συχνά με τον όρο *ιστονικός κώδικας* (histone code).

23.6 Η ακετυλίωση ιστονών συμβαίνει σε δύο περιπτώσεις

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η ακετυλίωση των ιστονών συμβαίνει παροδικά κατά την αντιγραφή.
- ▶ Η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης.

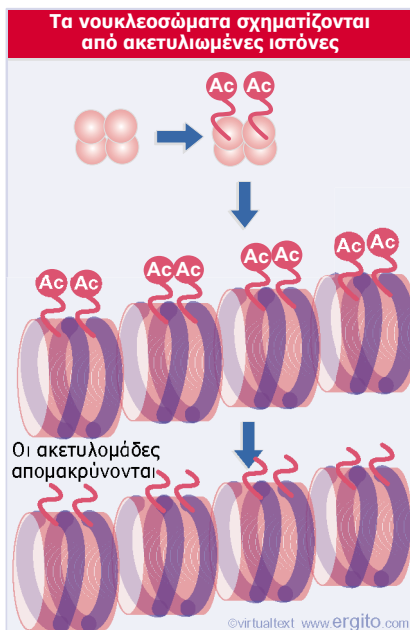
Όλες οι ιστόνες του νουκλεοσωμικού πυρήνα μπορούν να ακετυλωθούν. Οι κυριότεροι στόχοι ακετυλίωσης είναι οι λυσίνες των N-τελικών ουρών των ιστονών H3 και H4. Η ακετυλίωση συμβαίνει σε δύο περιπτώσεις:

- ▶ κατά την αντιγραφή του DNA.
- ▶ κατά την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης.

Όταν τα χρωμοσώματα αντιγράφονται, κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, οι ιστόνες υφίστανται παροδική ακετυλίωση. Στην **Εικόνα 23.11** φαίνεται ότι αυτού του είδους η ακετυλίωση συμβαίνει πριν την ενσωμάτωση των ιστονών στα νουκλεοσώματα. Γνωρίζουμε ότι οι ιστόνες H3 και H4 ακετυλιώνονται στο στάδιο κατά το οποίο συνδέονται η μία με την άλλη, ώστε να σχηματίσουν το τετραμερές $H3_2 \cdot H4_2$. Το τετραμερές στη συνέχεια ενσωματώνεται στα νουκλεοσώματα. Ακολούθως, και μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, οι ακετυλομάδες αφαιρούνται από τις νουκλεοσωμικές ιστόνες.

Η σημασία της ακετυλίωσης φαίνεται από το γεγονός ότι η παρεμπόδιση της ταυτόχρονα και στις δύο ιστόνες H3 και H4, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, επιφέρει το θάνατο στη ζύμη. Οι δύο ιστόνες είναι λειτουργικά πλεονάζουσες ως υποστρώματα για ακετυλίωση, αφού αρκεί να τροποποιηθεί η μία από τις δύο ιστόνες κατά τη φάση S, ώστε να είναι δυνατή η ολοκλήρωση της αντιγραφής. Οι πιθανοί ρόλοι της ακετυλίωσης κατά τη φάση αυτή είναι δύο: μπορεί να χρειάζεται για την αναγνώριση των ιστονών από τους παράγοντες που τις ενσωματώνουν στα νουκλεοσώματα ή για τη συναρμολόγηση και/ή διαμόρφωση της δομής των νέων νουκλεοσωμάτων.

Οι παράγοντες που γνωρίζουμε ότι ενέχονται στη συναρμολόγηση της χρωματίνης δεν είναι σε θέση να διακρίνουν τις ακετυλιωμένες από τις μη ακετυλιωμένες ιστόνες, υποδηλώνοντας ότι η τροποποίηση πιθανότατα απαιτείται για την πραγματοποίηση αλληλεπιδράσεων σε κάποιο επόμενο στάδιο. Είναι πιθανόν η ακετυλίωση να μπορεί να βοηθάει στον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης με πρωτεΐνη, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την ενσωμάτωση των ιστονών στα νουκλεοσώματα. Ένδειξη για έναν τέτοιο ρόλο της ακετυλίωσης είναι ότι το σύμπλοκο της ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών SAS της ζύμης προσδένεται σε σύμπλοκα συναρμολόγησης της χρω-

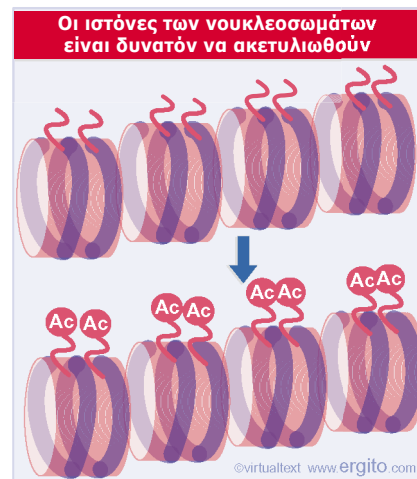


Εικόνα 23.11 Στη φάση της αντιγραφής, οι ιστόνες υφίστανται ακετυλίωση πριν ενσωματωθούν σε νουκλεοσώματα.

ματίνης πάνω στη διχάλα αντιγραφής, όπου ακετυλιώνει το κατάλοιπο ^{16}Lys της ιστόνης H4. Επομένως το σύμπλοκο SAS ίσως αποτελεί μέρος του συστήματος που καθιερώνει τα πρότυπα ακετυλίωσης των ιστονών μετά την αντιγραφή.

Εκτός της φάσης S, η ακετυλίωση των ιστονών της χρωματίνης συσχετίζεται με τη γονιδιακή έκφραση. Η συσχέτιση αυτή αρχικά διαπιστώθηκε από την παρατήρηση αυξημένων επιπέδων ακετυλίωσης των ιστονών σε επικράτειες του γονιδιώματος που περιέχουν μεταγραφόμενα γονίδια, καθώς και από την ευαισθησία της ακετυλιωμένης χρωματίνης σε πέψη με DNAάση I και (πιθανόν) μικροκοκκική νουκλεάση. Στην **Εικόνα 23.12** φαίνεται ότι τέτοια φαινόμενα αφορούν την ακετυλίωση της ουράς των ιστονών που ήδη έχουν ενσωματωθεί σε νουκλεοσώματα. Είναι γνωστό σήμερα ότι η ακετυλίωση των ιστονών είναι συνηθισμένη σε νουκλεοσώματα που βρίσκονται σε περιοχές υποκινητών ενεργών γονιδίων.

Εκτός από τις αλλαγές που συμβαίνουν σε μεμονωμένους υποκινητές, πραγματοποιούνται επίσης αλλαγές μεγάλης κλίμακας. Τέτοια τροποποίηση είναι, για παράδειγμα, η ακετυλίωση των φυλετικών χρωμοσωμάτων, η οποία αποτελεί τμήμα του μηχανισμού που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του χρωμοσώματος X, προκειμένου να αντισταθμιστούν τα επίπεδα έκφρασης των φυλοσύνδετων γονιδίων στα δύο φύλα (τα οποία μπορεί να φέρουν διαφορετικό αριθμό φυλετικών χρωμοσωμάτων X) ενός οργανισμού (βλ. 23.17: *Τα χρωμοσώματα X υφίστανται τροποποιήσεις σε όλη την έκτασή τους*). Στα θηλαστικά, για παράδειγμα, η ιστόνη H4 είναι υπο-ακετυλιωμένη στο απενεργοποιημένο χρωμόσωμα X των θηλυκών ατόμων, ώστε να επιτρέπεται έκφραση μόνο ενός (ενεργού) χρωμοσώματος X. Αυτό εξομοιώνει τα επίπεδα έκφρασης των φυλοσύνδετων γονιδίων με τα αρσενικά άτομα, τα οποία φέρουν στα κύτταρά τους μόνο ένα φυλετικό χρωμόσωμα X (που ζευγαρώνει με το Y). Από την άλλη, το υπερενεργό χρωμόσωμα X των αρσενικών ατόμων της *Drosophila* παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία των ακετυλομάδων ίσως είναι προϋπόθεση για μια λιγότερο πυκνή και συνεπώς πιο ενεργή δομή της χρωματίνης. Στα αρσενικά άτομα της *Drosophila*, το χρωμόσωμα X ακετυλιώνεται με ειδικό τρόπο στα κατάλοιπα ^{16}Lys της ιστόνης H4. Η υπεύθυνη ακετυλοτρανσφεράση HAT (**H**istone **A**cetyl**t**ransferase, ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών) είναι ένα ένζυμο, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ονομάζεται MOF, το οποίο στρατολογείται στο χρωμόσωμα ως υπομονάδα ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου. Αυτό το σύμπλοκο «αντιστάθμισης γονιδιακής δόσης» (dosage compensation) ευθύνεται για την επαγωγή στο χρωμόσωμα X των γενικευμένων αλλαγών που επιτρέπουν την έκφραση των γονιδίων του σε υψηλότερο επίπεδο από το αναμενόμενο. Η αυξημένη ακετυλίωση είναι μία από τις πολυάριθμες ενεργότητες αυτού του συμπλόκου.



Εικόνα 23.12 Η ακετυλίωση που σχετίζεται με την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται με άμεση τροποποίηση των ιστονών που συγκροτούν τα νουκλεοσώματα.

23.7 Οι ακετυλάσες συνδέονται με ενεργοποιητές

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η απακετυλιωμένη χρωματίνη μπορεί να έχει πιο συμπαγή δομή.
- ▶ Οι ενεργοποιητές της μεταγραφής συνδέονται με ακετυλο-τρανσφεράσες των ιστονών σε μεγάλα σύμπλοκα.
- ▶ Οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών εξειδικεύονται για διαφορετικούς στόχους.
- ▶ Η ακετυλίωση θα μπορούσε να επηρεάζει τη μεταγραφή με ποσοτικό ή ποιοτικό τρόπο.

Η ακετυλίωση είναι αντιστρεπτή διαδικασία. Κάθε κατεύθυνση της αντίδρασης καταλύεται από διαφορετικό ειδικό τύπο ενζύμων. Τα ένζυμα που ακετυλιώνουν τις ιστόνες ονομάζονται **ακετυλάσες** (acetylases) ή **ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών** ή **HAT** (Histone Acetyltransferases). Οι ακετυλομάδες αφαιρούνται από τις **απακετυλάσες των ιστονών** ή **HDAC** (Histone Deacetylases). Υπάρχουν δύο ομάδες ενζύμων HAT: στην ομάδα A ανήκουν εκείνα που ενέχονται στη μεταγραφή ενώ στην ομάδα B εκείνα που ενέχονται στη συναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων.

Δύο καταστολείς ενζύμων φάνηκαν ιδιαίτερα χρήσιμοι για την ανάλυση της ακετυλίωσης των ιστονών. Η τριχοστατίνη και το βουτυρικό οξύ καταστέλλουν τις απακετυλάσες των ιστονών και προκαλούν τη συσσώρευση ακετυλιωμένων νουκλεοσωμάτων. Οι συνέπειες της επίδρασης αυτών των καταστολέων υποστηρίζουν τη γενική άποψη ότι η ακετυλίωση σχετίζεται με τη γονιδιακή έκφραση. Πράγματι, η ικανότητα του βουτυρικού οξέος να προκαλεί αλλαγές στη χρωματίνη, παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιδιακή ενεργοποίηση, υπήρξε μία από τις πρώτες ενδείξεις για τη σχέση ανάμεσα στην ακετυλίωση και στη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων.

Ο χαρακτηρισμός των ακετυλοτρανσφερασών και των απακετυλασών, καθώς και του ρόλου τους στη συγκρότηση συμπλόκων με άλλες πρωτεΐνες που ενέχονται σε ειδικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης και καταστολής έδωσαν μεγάλη ώθηση στην ανάλυση του ρόλου της ακετυλίωσης των ιστονών. Η ανακάλυψη ότι οι HAT δεν είναι ένζυμα που σχετίζονται αποκλειστικά με τη χρωματίνη, αλλά ότι αποτελούν ενεργότητα ορισμένων ήδη γνωστών ενεργοποιητών της μεταγραφής, οδήγησε σε ουσιαστική αλλαγή της αντίληψής μας για την ακετυλίωση των ιστονών.

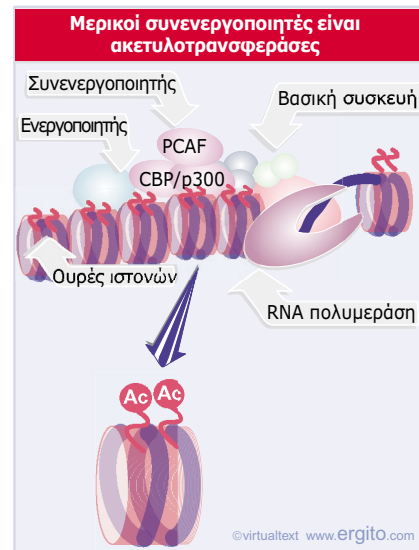
Η σχέση αυτή καθιερώθηκε όταν η καταλυτική υπομονάδα μιας πρωτεΐνης HAT της ομάδας A αναγνωρίστηκε ως ομόλογη της ρυθμιστικής πρωτεΐνης GCN5 της ζύμης. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι η ίδια η GCN5 διαθέτει ενεργότητα HAT και ότι είναι σε θέση να χρησιμοποιεί τις ιστόνες H3 και H4 ως υποστρώματα. Η GCN5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

Αυτό το αποτέλεσμα οδήγησε στην αναθεώρηση της αντίληψής μας για τους συνενεργοποιητές (co-activators), η δράση των οποίων περιγράφεται στην **Εικόνα 23.13**. Σύμφωνα με το νέο αυτό μοντέλο, η RNA πολυμεράση προσδένεται σε μια υπερευαίσθητη θέση και μαζί με αυτή στρατολογούνται οι συνενεργοποιητές, οι οποίοι ακετυλιώνουν τις ιστόνες στα γύρω νουκλεοσώματα. Σήμερα γνωρίζουμε πολλά παραδείγματα τέτοιων αλληλεπιδράσεων.

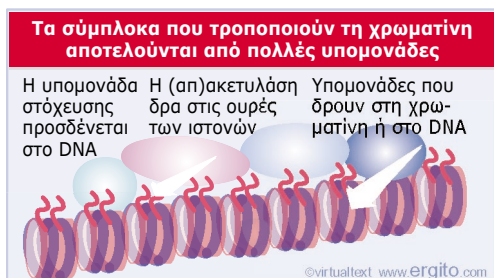
Η μελέτη της GCN5 μας οδήγησε στην ανακάλυψη ενός από τα πιο σημαντικά σύμπλοκα ακετυλοτρανσφεράσης. Στη ζύμη, η GCN5 αποτελεί τμήμα του συμπλόκου SAGA, το οποίο έχει μέγεθος 1,8 MDa και περιέχει αρκετές πρωτεΐνες που ενέχονται στη μεταγραφή. Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες περιλαμβάνονται αρκετοί παράγοντες TAF_{II}. Επίσης, η υπομονάδα TAF_{II}145 του παράγοντα TF_{II}D διαθέτει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης. Υπάρχουν ορισμένες λειτουργικές αλληλεπικαλύψεις ανάμεσα στον TF_{II}D και στο σύμπλοκο SAGA, έτσι ώστε η ζύμη να μπορεί να λειτουργήσει εξίσου καλά όταν απουσιάζει είτε ο TAF_{II}145 είτε η GCN5, αλλά να αντιμετωπίζει προβλήματα όταν εκλείψουν και οι δύο παράγοντες ταυτόχρονα. Αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης είναι μεν ουσιώδης για τη γονιδιακή έκφραση, αλλά μπορεί να προσφερθεί είτε από τον TF_{II}D είτε από το SAGA. Όπως είναι αναμενόμενο από το μέγεθος του συμπλόκου SAGA, η ακετυλίωση αποτελεί μόνο μία από τις πολλές λειτουργίες του. Ωστόσο, ο ρόλος των υπόλοιπων λειτουργιών στη γονιδιακή ενεργοποίηση δεν έχει χαρακτηριστεί στον ίδιο βαθμό.

Ένας από τους πρώτους γενικούς ενεργοποιητές της μεταγραφής που χαρακτηρίστηκε ως HAT ήταν ο p300/CBP. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες (p300 και CBP), οι οποίες όμως είναι τόσο συγγενικές μεταξύ τους, ώστε συχνά αναφέρονται σαν να πρόκειται για ένα πολυπεπτιδίο. Ο p300/CBP είναι ένας συνενεργοποιητής, δηλαδή συνδέει έναν ενεργοποιητή με τη βασική συσκευή (βλ. Εικόνα 22.7). Ο p300/CBP αλληλεπιδρά με ποικίλους ενεργοποιητές, όπως οι υποδοχείς ορμονών, ο AP-1 (c-Jun και c-Fos) και ο MyoD. Η αλληλεπίδραση καταστέλλεται από τις ικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1A του αδενοϊού και το αντιγόνο T του SV40, τα οποία προσδένονται στον p300/CBP και εμποδίζουν την αλληλεπίδρασή του με τους μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι εξηγείται πώς αυτές οι ικές πρωτεΐνες καταστέλλουν την κυτταρική μεταγραφή. Αυτή η καταστολή είναι σημαντική για την ογκογονικότητα των ικών πρωτεϊνών (βλ. 30.18: *Οι ογκοπρωτεΐνες μπορεί να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση*).

Ο p300/CBP ακετυλιώνει τις N-τελικές ουρές της H4 στα νουκλεοσώματα. Ένας δεύτερος συνενεργοποιητής, ο PCAF, ακετυλιώνει επιλεκτικά την H3 στα νουκλεοσώματα. Οι p300/CBP και PCAF σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που δρα κατά την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Σε ορισμένες περιπτώσεις συμμετέχει και μια ακόμη HAT: ο συνενεργοποιητής ACTR, ο οποίος συνεργάζεται με ορμονικούς υποδοχείς, είναι μια HAT που επιδρά στις ιστόνες H3 και H4, ενώ είναι επίσης σε θέση να στρατολογεί τους p300/CBP και PCAF, ώστε να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο συνενεργοποίησης. Μια πιθανή ερμηνεία για την ύπαρξη πολλαπλών ενεργοτήτων HAT σε ένα σύμπλοκο συνενεργοποίησης είναι ότι η καθεμία έχει διαφορετική ειδικότητα και ότι απαιτείται η ακετυλίωση πολλαπλών διαφορετικών υποστρωμάτων για την ενεργοποίηση ενός γονιδίου.



Εικόνα 23.13 Οι συνενεργοποιητές μπορεί να διαθέτουν ενεργότητες HAT, οι οποίες ακετυλιώνουν τις ουρές των νουκλεοσωμικών ιστονών.



Εικόνα 23.14 Τα σύμπλοκα που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης ή την ενεργότητά της φέρουν υπομονάδες στόχευσης που καθορίζουν τις θέσεις δράσης τους πάνω στο DNA, ενζυμικές υπομονάδες HAT ή HDAC που ακετυλιώνουν ή απακετυλιώνουν τις ιστόνες, καθώς και άλλες υπομονάδες που ασκούν επιπλέον επιδράσεις στη χρωματίνη ή στο DNA.

Ένα γενικό χαρακτηριστικό των HAT είναι η ιδιότητά τους να ενσωματώνονται σε μεγάλα σύμπλοκα. Στην **Εικόνα 23.14** παρουσιάζεται ένα απλοποιημένο μοντέλο αυτής της συμπεριφοράς τους. Τυπικά, το σύμπλοκο περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπομονάδες στόχευσης, οι οποίες αναγνωρίζουν τις θέσεις πρόσδεσης στο DNA προσδιορίζοντας τους στόχους της HAT. Το σύμπλοκο περιέχει επίσης υπομονάδες που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης ή επιδρούν άμεσα στη μεταγραφή. Πιθανότατα, η ακετυλίωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να δράσουν ορισμένες τουλάχιστον από αυτές τις υπομονάδες του συμπλόκου. Η απακετυλίωση, που καταλύεται από κάποια HDAC, μπορεί να πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο.

Η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα τόσο κατά την αντιγραφή (οπότε είναι παροδική) όσο και κατά τη μεταγραφή (οπότε διατηρείται όσο το γονίδιο παραμένει ενεργό). Άραγε διαδραματίζει τον ίδιο ρόλο και στις δύο περιπτώσεις; Ενδεχομένως, αυτό που έχει σημασία είναι η επίδρασή της στη διαμόρφωση της δομής του νουκλεοσώματος. Η ακετυλίωση ίσως να «χαλαρώνει» τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Κατά την αντιγραφή, η ακετυλίωση ίσως είναι απαραίτητη για να διευκολυνθεί η ενσωμάτωση των ιστονών στους νέους νουκλεοσωμικούς πυρήνες, ενώ, κατά τη μεταγραφή, η ακετυλίωση είναι ίσως απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί μια παρόμοια αλλαγή στη δομή της χρωματίνης ή ακόμη και για να εκτοπιστεί ο ιστονικός πυρήνας από το ενεργό DNA. Εναλλακτικά, η ακετυλίωση πιθανόν να δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη μεταγραφή. Σε κάθε περίπτωση, η απακετυλίωση θα πρέπει να αντιστρέφει το αποτέλεσμα της ακετυλίωσης.

Η επίδραση της ακετυλίωσης είναι άραγε ποσοτική ή ποιοτική; Ένα ενδεχόμενο είναι ότι απαιτείται ένας συγκεκριμένος αριθμός ακετυλομάδων ώστε να υπάρξει επίδραση, χωρίς να έχει ιδιαίτερη σημασία ποιες ακριβώς είναι οι θέσεις που ακετυλιώνονται. Εναλλακτικά, ίσως μια εξειδικευμένη διαδικασία ακετυλίωσης να καθορίζει το είδος της επίδρασης ανάλογα με την περίπτωση. Θα μπορούσαμε να ερμηνεύσουμε την ύπαρξη συμπλόκων με πολλαπλές ενεργότητες HAT και με τους δύο τρόπους: εάν κάθε ξεχωριστό ένζυμο έχει διαφορετική ειδικότητα, τότε ίσως απαιτούνται πολλαπλές διακριτές ενεργότητες, είτε για να ακετυλιωθεί ένας επαρκής αριθμός διαφορετικών θέσεων είτε επειδή κάθε ακετυλίωση οδηγεί σε διαφορετικού είδους επίδραση στη μεταγραφή. Στην αντιγραφή, τουλάχιστον όσον αφορά την ιστόνη H4, φαίνεται ότι η ακετυλίωση δύο οποιωνδήποτε από τις τρεις διαθέσιμες θέσεις είναι επαρκής, υποστηρίζοντας σε αυτήν την περίπτωση το ποσοτικό μοντέλο. Στις περιπτώσεις, όμως, που αλλάζει η δομή της χρωματίνης για να ρυθμιστεί η μεταγραφή, πιο σημαντική είναι μάλλον η ακετυλίωση συγκεκριμένων ειδικών θέσεων (βλ. 23.15: *Ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις ειδικών πρωτεϊνών με τις ιστόνες*).

23.8 Οι απακετυλάσεις συνδέονται με καταστολείς

Σημαντικές έννοιες

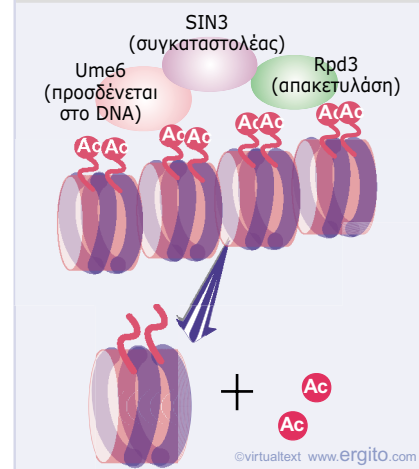
- ▶ Η απακετυλίωση σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.
- ▶ Οι απακετυλάσεις εντοπίζονται σε σύμπλοκα με κατασταλτική δράση.

Στη ζύμη, η μελέτη μεταλλαγμάτων των γενετικών τόπων *SIN3* και *Rpd3* υποδεικνύει ότι ενέχονται στην καταστολή πολλών γονιδίων. Οι πρωτεΐνες *SIN3* και *Rpd3* σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη *Ume6*, το οποίο προσδένεται στο στοιχείο *URS1* του DNA. Το σύμπλοκο καταστέλλει τη μεταγραφή των υποκινητών που φέρουν το στοιχείο *URS1*, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.15**. Η *Rpd3* έχει ενεργότητα απακετυλάσης ιστονών. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν η λειτουργία της *Sin3* είναι απλώς να οδηγεί την *Rpd3* στον υποκινητή ή αν έχει και κάποιον άλλο ρόλο στην καταστολή.

Στα κύτταρα των θηλαστικών βρίσκεται ένα παρόμοιο σύστημα καταστολής. Η οικογένεια των μεταγραφικών ρυθμιστών bHLH περιλαμβάνει ενεργοποιητές που λειτουργούν ως ετεροδιμερή, όπως ο *MyoD* [βλ. 22.15: *Οι πρωτεΐνες έλικα-βρόχος-έλικα (HLH) δημιουργούν συνδυασμούς συμπλόκων*]. Περιλαμβάνει επίσης καταστολείς, όπως το ετεροδιμερές *Mad:Max*. Η υπομονάδα *Mad* αυτού του ετεροδιμερούς μπορεί να είναι οποιοσδήποτε από μια ομάδα στενά συγγενικών ρυθμιστικών παραγόντων. Το ετεροδιμερές *Mad:Max*, το οποίο προσδένεται σε ειδικές θέσεις στο DNA, αλληλεπιδρά με ένα ομόλογο της *Sin3* που ονομάζεται *mSin3* στον ποντικό και *hSin3* στον άνθρωπο. Η *mSin3* συμμετέχει σε ένα σύμπλοκο καταστολής, το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες που προσδένονται σε ιστόνες, καθώς και τις απακετυλάσεις HDAC1 και HDAC2. Η ενεργότητα απακετυλάσης είναι απαραίτητη για την καταστολή. Η σπονδυλωτή φύση του συστήματος υποδεικνύεται και από άλλα παραδείγματα: ο συγκαταστολέας SMRT, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα στους υποδοχείς ρετινοειδών ορμονών να καταστέλλουν ορισμένα γονίδια-στόχους (απουσία ορμονικού προσδέτη), λειτουργεί δεσμεύοντας την *mSin3*, η οποία με τη σειρά της προσελκύει τις ενεργότητες HDAC στη συγκεκριμένη θέση. Ένας άλλος μηχανισμός στρατολόγησης ενεργοτήτων HDAC στη χρωματίνη είναι η σύνδεσή τους με την *MeCP2*, μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες (βλ. 21.19: *Οι νησίδες CpG αποτελούν στόχο ρύθμισης*).

Η απουσία ακετυλίωσης από τις ιστόνες αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της ετεροχρωματίνης. Αυτό ισχύει τόσο για την ιδιοστατική ετεροχρωματίνη, η οποία συνήθως καταλαμβάνει τις περιοχές των κεντρομερών και τελομερών, όσο και για την εναλλακτική ετεροχρωματίνη, δηλαδή τις περιοχές εκείνες του γονιδιώματος που είναι μεταγραφικά απενεργοποιημένες σε ένα κύτταρο, αλλά μπορεί να είναι ενεργές σε ένα άλλο. Τυπικά, στην ετεροχρωματίνη, οι N-τελικές ουρές των ιστονών H3 και H4 δεν είναι ακετυλιωμένες.

Η απακετυλίωση καταστέλλει τη μεταγραφή



Εικόνα 23.15 Ένα σύμπλοκο καταστολής αποτελείται από τρία μέρη: μία υπομονάδα πρόσδεσης στο DNA, ένα συγκαταστολέα και μία απακετυλάση των ιστονών.

23.9 Η μεθυλίωση των ιστονών σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η μεθυλίωση τόσο του DNA όσο και των ιστονών είναι ένα γνώρισμα της ανενεργής χρωματίνης.
- ▶ Οι δύο τύποι μεθυλίωσης μπορεί να συνδέονται.

Η μεθυλίωση τόσο των ιστονών όσο και του DNA σχετίζεται με μεταγραφική αδράνεια. Οι θέσεις των ιστονών που μεθυλιώνονται περιλαμβάνουν δύο λυσίνες στην ουρά της H3 και μία αργινίνη στην ουρά της H4.

Η μεθυλίωση του καταλοίπου ^9Lys της H3 αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των συμπυκνωμένων περιοχών της χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένης της ετεροχρωματίνης που καλύπτει τόσο μεγάλες χρωμοσωμικές εκτάσεις όσο και μικρότερες περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες είναι μεταγραφικά ανενεργές. Το ένζυμο μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών που τροποποιεί αυτή τη λυσίνη ονομάζεται SUV39H1 (βλ. 23.14 *Οι πρωτεΐνες που τροποποιούν τη χρωματίνη έχουν ορισμένα κοινά μοτίβα*). Το καταλυτικό κέντρο αυτού του ενζύμου έχει μια περιοχή που ονομάζεται επικράτεια SET, η οποία ενέχεται στη μεθυλίωση ιστονών. Άλλες μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών δρουν πάνω σε κατάλοιπα αργινίνης. Επιπρόσθετα, είναι δυνατόν να μεθυλιωθεί το κατάλοιπο ^{79}Lys της σφαιρικής πυρηνικής περιοχής της H3. Αυτού του τύπου η μεθυλίωση πιστεύεται ότι είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης των τελομερών.

Η πλειοψηφία των θέσεων μεθυλίωσης στο DNA είναι νησίδες CpG (βλ. 21.19: *Οι νησίδες CpG αποτελούν στόχο ρύθμισης*). Στην ετεροχρωματίνη, οι αλληλουχίες CpG είναι συνήθως μεθυλιωμένες. Αντίθετα, οι νησίδες CpG που εντοπίζονται σε περιοχές υποκινητών απαιτείται να είναι μη μεθυλιωμένες προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο (βλ. 21.18: *Η γονιδιακή έκφραση συνδέεται με την απομεθυλίωση*).

Πιστεύεται ότι υπάρχει σύνδεση ανάμεσα στη μεθυλίωση του DNA και στη μεθυλίωση των ιστονών. Ορισμένες μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών περιέχουν εν δυνάμει θέσεις πρόσδεσης στο μεθυλιωμένο δινουκλεοτίδιο CpG. Επομένως είναι πιθανόν η μεθυλίωση του DNA να οδηγεί σε πρόσδεση μιας μεθυλοτρανσφεράσης που με τη σειρά της μεθυλιώνει τις παρακείμενες ιστόνες της περιοχής. Μια ανάλογη σχέση μεθυλίωσης DNA και ιστονών –αλλά προς την αντίστροφη κατεύθυνση αυτή τη φορά– υποδηλώνεται από το ότι στο μύκητα *Neurospora* η μεθυλίωση του DNA παρεμποδίζεται από τη μετάλλαξη μιας μεθυλοτρανσφεράσης, η οποία επιδρά στο κατάλοιπο ^9Lys της ιστόνης H3. Αυτό υποδεικνύει ότι η μεθυλίωση της ιστόνης λειτουργεί ως σήμα που επάγει τη στρατολόγηση της μεθυλοτρανσφεράσης του DNA στη χρωματίνη. Το σημαντικό, πάντως, είναι ότι δεν έχει σημασία τόσο η ακριβής σειρά των γεγονότων –η οποία άλλωστε παραμένει αδιευκρίνιστη– όσο το ότι ο ένας τύπος τροποποίησης μπορεί να επάγει τον άλλο.

23.10 Οι τροποποιήσεις των ιστονών μεταβάλλουν αντιστρεπτά την κατάσταση της χρωματίνης

Σημαντικές έννοιες

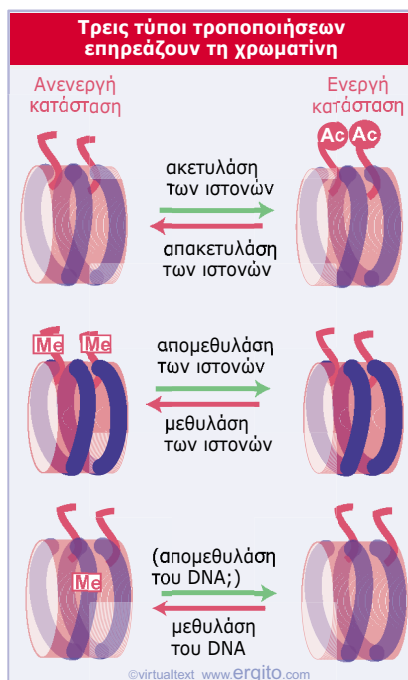
- ▶ Η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με τη γονιδιακή ενεργοποίηση.
- ▶ Η μεθυλίωση του DNA και των ιστονών σχετίζεται με το σχηματισμό ετεροχρωματίνης.

Στην **Εικόνα 23.16** συνοψίζονται τρεις βασικές διαφορές της ενεργής από την ανενεργή χρωματίνη:

- ▶ Η ενεργή χρωματίνη είναι ακετυλιωμένη στις ουρές των ιστονών H3 και H4.
- ▶ Η ανενεργή χρωματίνη είναι μεθυλιωμένη στο κατάλοιπο ^9Lys της ιστόνης H3.
- ▶ Η ανενεργή χρωματίνη είναι μεθυλιωμένη στις κυτοσίνες των νησίδων CpG.

Συγκρίνοντας την ενεργοποίηση ενός υποκινητή με το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης διαπιστώνουμε ότι οι δύο αυτές διαδικασίες ενέχουν αντίθετους τύπους τροποποιήσεων της χρωματίνης. Η δράση των ενζύμων που τροποποιούν τη χρωματίνη εξασφαλίζει ότι τα γεγονότα που οδηγούν στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή αλληλοεξαιρούνται. Δηλαδή η μεθυλίωση του καταλοίπου ^9Lys της H3 και η ακετυλίωση του καταλοίπου ^{14}Lys της H3 είναι αντιδράσεις αμοιβαία μη συμβατές.

Οι ακετυλοτρανσφεράσες και οι απακετυλάσες είναι πιθανόν να αποτελούν το έναυσμα για περαιτέρω αντιδράσεις. Η απακετυλίωση επιτρέπει να πραγματοποιηθεί η μεθυλίωση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου ετεροχρωματίνης (βλ. 23.15: *Ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις ειδικών πρωτεϊνών με τις ιστόνες*). Αντίστροφα, η ακετυλίωση προσδιορίζει τις ενεργές περιοχές της χρωματίνης (βλ. επόμενη Ενότητα).



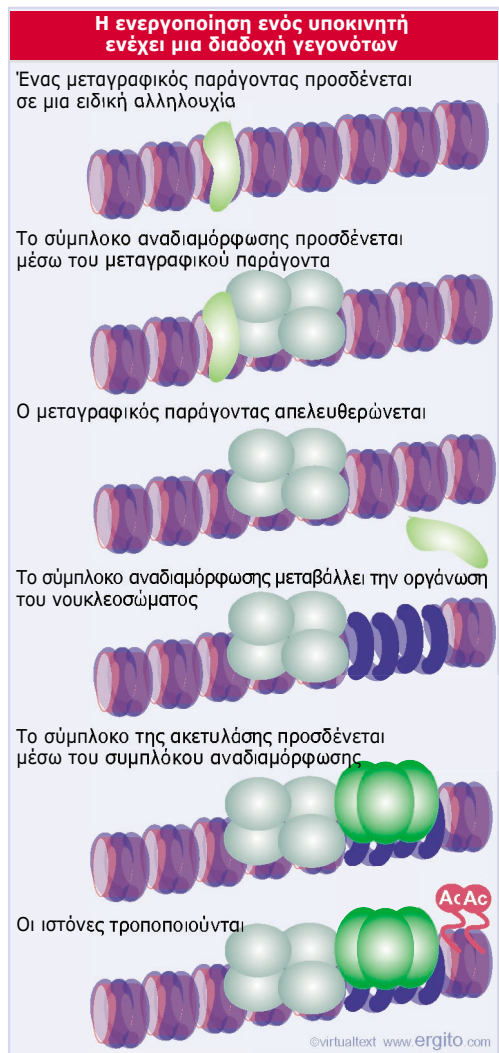
Εικόνα 23.16 Η ακετυλίωση των ιστονών ενεργοποιεί τη χρωματίνη, ενώ η μεθυλίωση του DNA και των ιστονών απενεργοποιεί τη χρωματίνη.

23.11 Η ενεργοποίηση του υποκινητή περιλαμβάνει πολλά στάδια

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Ένα σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης είναι πιθανόν να στρατολογεί ένα σύμπλοκο ακετυλοτρανσφεράσης.
- ▶ Η ακετυλίωση των ιστονών είναι πιθανόν να διατηρεί ένα γενετικό τόπο στην ενεργή του κατάσταση.

Πώς στρατολογούνται οι ακετυλοτρανσφεράσες (ή οι απακετυλάσες) στις ειδικές θέσεις-στόχους τους; Όπως έχουμε ήδη αναλύσει για τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, η διαδικασία πιθανόν να είναι έμμεση. Ένας ειδικός για μια συγκεκριμένη αλληλουχία ενεργοποιητής (ή καταστολέας) μπορεί να αλληλεπιδρά με ένα



Εικόνα 23.17 Η ενεργοποίηση ενός υποκινητή περιλαμβάνει αρχικά την πρόσδεση ενός ειδικού ενεργοποιητή και στη συνέχεια τη στρατολόγηση και τη δράση ενός συμπλόκου αναδιαμόρφωσης και ενός συμπλόκου ακετυλίωσης της χρωματίνης.

συστατικό του συμπλόκου της ακετυλοτρανσφεράσης (ή απακετυλάσης) και να το στρατολογήει στον υποκινητή.

Επίσης, τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης μπορεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με τα σύμπλοκα τροποποίησης των ιστονών. Η πρόσδεση του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης SWI/SNF μπορεί να οδηγεί στην πρόσδεση του συμπλόκου της ακετυλοτρανσφεράσης SAGA. Η ακετυλίωση των ιστονών μπορεί στη συνέχεια να σταθεροποιεί τη σύνδεση του συμπλόκου SWI/SNF, προκαλώντας ενίσχυση των τροποποιήσεων στα στοιχεία της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή.

Μπορούμε να αναπαραστήσουμε τα διαδοχικά γεγονότα που συμβαίνουν στον υποκινητή κατά την ενεργοποίησή του, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.17**. Αρχικά προσδένεται ένας παράγοντας σε μια ειδική αλληλουχία του υποκινητή. Ο παράγοντας αυτός θα πρέπει να είναι ικανός να βρίσκει την αλληλουχία-στόχο όταν αυτή βρίσκεται σε οργανωμένη χρωματινική δομή. Η πρόσδεση επιτρέπει τη στρατολόγηση ενός συμπλόκου αναδιαμόρφωσης, με συνέπεια να αλλάζει η δομή του νουκλεοσώματος. Ακολούθως, προσδένεται ένα σύμπλοκο ακετυλοτρανσφεράσης και η ακετυλίωση των ιστονών-στόχων σηματοδοτεί οριστικά την ενεργοποίηση του γενετικού τόπου.

Στον υποκινητή συμβαίνει επίσης τροποποίηση του DNA. Η μεθυλίωση της κυτοσίνης στα δινουκλεοτίδια CpG συσχετίζεται με την απενεργοποίηση των γονιδίων (βλ. 21.18: *Η γονιδιακή έκφραση συνδέεται με την απομεθυλίωση*). Η βασική αρχή που διέπει την αναγνώριση του DNA ως στόχου για μεθυλίωση δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη (βλ. 23.20: *Η μεθυλίωση του DNA ευθύνεται για το εντύπωμα*).

Είναι σαφές ότι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή απαιτεί μια πληθώρα αλλαγών που επηρεάζουν τα νουκλεοσώματα, όπως η ακετυλίωση. Ποιες είναι όμως οι αλλαγές που πρέπει να συμβούν στην περιοχή του γονιδίου ώστε να επιτραπεί η μεταγραφή του από την RNA πολυμεράση; Είναι γνωστό ότι η RNA πολυμεράση μπορεί να καταλύει τη μεταγραφή *in vitro* με ρυθμό συγκρίσιμο αυτού της μεταγραφής *in vivo*, αλλά μόνο όταν χρησιμοποιεί ελεύθερο DNA ως μήτρα. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν την ταχύτητα με την οποία η RNA πολυμεράση μεταγράφει χρωματίνη *in vivo*. Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι επιδρούν απευθείας στη χρωματίνη. Ένα πρόσφατο μοντέλο για τη δράση τέτοιων πρωτεϊνών προβλέπει τη σύνδεσή τους με την RNA πολυμεράση και τη μεταφορά μαζί της κατά μήκος της μήτρας, έτσι ώστε να τροποποιούν τη δομή των νουκλεοσωμάτων επιδρώντας στις ιστόνες. Σε αυτήν την ομάδα παραγόντων ανήκουν και οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών. Είναι πιθανόν η πρώτη RNA πολυμεράση που μεταγράφει ένα γονίδιο να είναι μια πολυμεράση-πρωτοπόρος (pioneer polymerase), η οποία φέρει τους παράγοντες που απαιτούνται για την αλλαγή της δομής της μεταγραφικής μονάδας, έτσι ώστε να διευκολύνεται η διέλευση των επόμενων πολυμερασών.

23.12 Η φωσφορυλίωση των ιστονών επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Τουλάχιστον δύο ιστόνες είναι στόχοι φωσφορυλίωσης, πιθανόν προκαλώντας αντίθετα αποτελέσματα.

Οι ιστόνες φωσφορυλιώνονται σε δύο περιπτώσεις:

- ▶ περιοδικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.
- ▶ κατά την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης.

Είναι γνωστό εδώ και πολύ καιρό ότι η ιστόνη H1 φωσφορυλιώνεται κατά τη μίτωση και ότι —όπως ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα— αποτελεί ένα εξαιρετικά καλό υπόστρωμα για την κινάση Cdc2, η οποία ελέγχει την κυτταρική διαίρεση. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση ίσως να σχετίζεται με τη συμπίκνωση της χρωματίνης, αλλά μέχρι στιγμής δεν έχει ανακαλυφθεί κάποια άμεση συνέπεια αυτού του είδους της τροποποίησης και δεν ξέρουμε αν πράγματι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην κυτταρική διαίρεση (βλ. 29.7: *Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο*).

Η απώλεια της κινάσης JIL-1, η οποία φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στο κατάλοιπο ^{10}Ser , έχει καταστροφικές συνέπειες για τη δομή της χρωματίνης. Στην **Εικόνα 23.18** συγκρίνεται η συνηθής εκτεταμένη δομή των πολυταινικών χρωμοσωμάτων της *D. melanogaster* (επάνω φωτογραφία) με τη δομή που παρατηρείται σε ένα μετάλλαγμα το οποίο δε διαθέτει την κινάση αυτή (κάτω φωτογραφία). Η απουσία της JIL-1 είναι θανατηφόρα, αν και τα χρωμοσώματα μπορούν να παρατηρηθούν σε προνύμφες πριν πεθάνουν.

Αιτία της ανώμαλης αυτής δομής της χρωματίνης είναι, κατά πάσα πιθανότητα, η αδυναμία φωσφορυλίωσης της ιστόνης H3 (βεβαίως, η JIL-1 μπορεί να έχει και άλλους στόχους). Φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση της H3 απαιτείται για τη δημιουργία της πιο εκτεταμένης χρωμοσωμικής δομής στις περιοχές της ευχρωματίνης. Μια ένδειξη που υποστηρίζει την άποψη ότι η JIL-1 επιδρά άμεσα στη χρωματίνη είναι ότι συνδέεται με το σύμπλοκο των πρωτεϊνών το οποίο προσδένεται στο υπερενεργό χρωμόσωμα X των αρσενικών ατόμων *Drosophila*, γεγονός που φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που εδράζονται πάνω σε αυτό (βλ. 23.17: *Τα χρωμοσώματα X υφίστανται τροποποιήσεις σε όλη την έκτασή τους*).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις μάς οδηγούν σε μάλλον αντιφατικά συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει η φωσφορυλίωση των ιστονών στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Εάν πράγματι είναι σημαντική στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, το πιο πιθανό είναι να λειτουργεί ως σήμα για συμπίκνωση. Παρ' όλα αυτά, οι επιδράσεις της στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης φαίνεται να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Υπάρχει ενδεχόμενο η φωσφορυλίωση διαφορετικών ιστονών ή ακόμη και διαφορετικών αμινοξέων μιας ιστόνης να έχει διαφορετικές συνέπειες στη δομή της χρωματίνης.



Εικόνα 23.18 Τα πολυταινικά χρωμοσώματα μεταλλαγμένων μυγών οι οποίες στερούνται κινάσης JIL-1 έχουν ανώμαλη μορφολογία και είναι συμπτυκνωμένα και όχι εκτεταμένα. Η φωτογραφία είναι ευγενική προσφορά της Kirsten M. Johansen.

23.13 Η ετεροχρωματίνη εξαπλώνεται από ένα κέντρο

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η ετεροχρωματίνη ξεκινά τον πολυμερισμό της από ειδικές αλληλουχίες του γονιδιώματος και η ανενεργή δομή που προκύπτει εξαπλώνεται κατά μήκος της ίνας χρωματίνης.
- ▶ Τα γονίδια που βρίσκονται σε περιοχές ετεροχρωματίνης απενεργοποιούνται.
- ▶ Επειδή το μήκος της περιοχής που τροποποιείται ποικίλλει από κύτταρο σε κύτταρο, τα γονίδια που απενεργοποιούνται κατά την εξαπλώση της ετεροχρωματίνης μπορεί να είναι διαφορετικά, προκαλώντας το φαινόμενο της ποικιλότητας λόγω θέσης.
- ▶ Παρόμοια φαινόμενα εξαπλώσης της ετεροχρωματίνης παρατηρούνται επίσης στα τελομερή και στις σιωπηλές κασέτες καθορισμού του συζευκτικού τύπου της ζύμης.

Η ποικιλότητα λόγω θέσης έχει ως συνέπεια τον ανομοιόμορφο χρωματισμό του ματιού



Εικόνα 23.19 Το φαινόμενο της ποικιλότητας λόγω θέσης στο χρώμα του ματιού της μύγας προκύπτει όταν το γονίδιο *white* ενσωματώνεται κοντά σε ετεροχρωματίνη. Τα κύτταρα στα οποία το *white* είναι απενεργοποιημένο σχηματίζουν λευκές περιοχές στο μάτι, ενώ τα κύτταρα στα οποία το *white* παραμένει ενεργό σχηματίζουν κόκκινες περιοχές. Η ένταση του φαινομένου καθορίζεται από το πόσο κοντά στην ετεροχρωματίνη βρίσκεται το ενσωματωμένο γονίδιο. Η φωτογραφία είναι ευγενική προσφορά του Steve Henikoff.

Ένας μεσοφασικός πυρήνας περιέχει ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη. Ο βαθμός συμπίκνωσης της ετεροχρωματίνης μοιάζει με εκείνον των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Η ετεροχρωματίνη είναι ανενεργή. Παραμένει συμπυκνωμένη κατά τη μεσόφαση, δε μεταγράφεται, αντιγράφεται καθυστερημένα προς το τέλος της φάσης S και μπορεί να εντοπίζεται στην πυρηνική περιφέρεια. Η κεντρομερική ετεροχρωματίνη αποτελείται τυπικά από δορυφορικό DNA. Ωστόσο, ο σχηματισμός της ετεροχρωματίνης δεν καθορίζεται αυστηρά από την αλληλουχία του DNA. Όταν ένα γονίδιο εισάγεται –είτε με χρωμοσωμική μετατόπιση είτε με διαμόλυνση και ενσωμάτωση– σε μια χρωμοσωμική θέση δίπλα στην ετεροχρωματίνη, μπορεί να απενεργοποιηθεί εξαιτίας της θέσης του, υποδηλώνοντας ότι έχει πλέον μετατραπεί σε ετεροχρωματινικό.

Η γονιδιακή απενεργοποίηση που αναφέρθηκε παραπάνω είναι αποτέλεσμα ενός **επιγενετικού** (epigenetic) φαινομένου (βλ. 23.22: *Ορισμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά κληρονομούνται*). Ο βαθμός απενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να είναι διαφορετικός μεταξύ των κυττάρων ενός οργανισμού και έχει ως συνέπεια το φαινόμενο της **ποικιλότητας λόγω θέσης** (PEV, **P**osition **E**ffect **V**ariation), κατά το οποίο γενετικά πανομοιότυπα κύτταρα εκδηλώνουν διαφορετικούς φαινοτύπους. Το φαινόμενο αυτό έχει αναλυθεί πολύ καλά στην *Drosophila*. Στην **Εικόνα 23.19** παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ποικιλότητας λόγω θέσης στο μάτι της μύγας, όπου κάποιες περιοχές είναι άχρωμες και κάποιες άλλες είναι κόκκινες, επειδή το γονίδιο *white* απενεργοποιείται από τη γειτονική ετεροχρωματίνη σε ορισμένα κύτταρα, ενώ παραμένει ενεργό σε κάποια άλλα.

Η ερμηνεία του φαινομένου αυτού περιγράφεται στην **Εικόνα 23.20**. Η απενεργοποίηση εξαπλώνεται από την ετεροχρωματίνη προς την παρακείμενη χρωμοσωμική περιοχή σε μεταβλητές αποστάσεις. Σε ορισμένα κύτταρα επεκτείνεται τόσο, ώστε να απενεργοποιεί ένα γειτονικό γονίδιο, ενώ σε άλλα σταματάει νωρίτερα. Η τροποποίηση

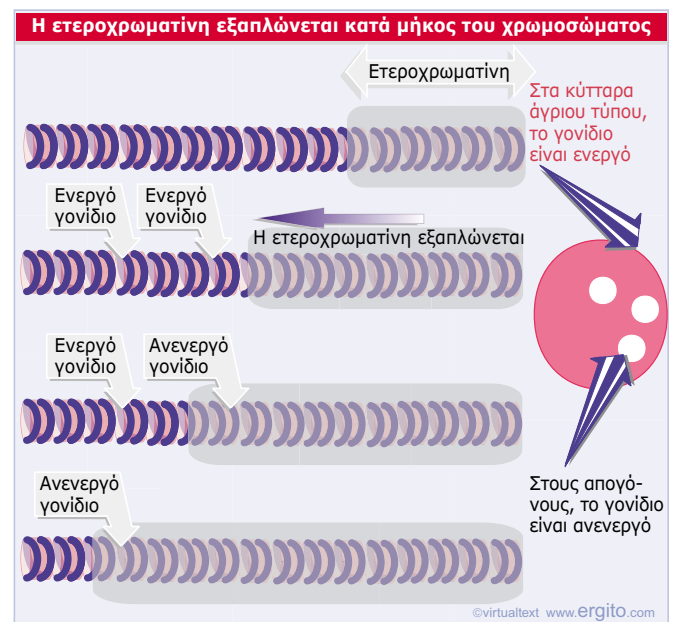
αυτή συμβαίνει σε μία συγκεκριμένη φάση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, μετά την οποία η κατάσταση του γονιδίου κληρονομείται αμετάβλητη από όλους τους απογόνους του αρχικού κυττάρου. Τα κύτταρα που προήλθαν από έναν πρόγονο στον οποίο το γονίδιο απενεργοποιήθηκε σχηματίζουν περιοχές που στερούνται του αντίστοιχου φαινοτύπου (π.χ. απώλεια χρώματος ματιού στην περίπτωση απενεργοποίησης του *white*).

Όσο πιο κοντά βρίσκεται ένα γονίδιο στην ετεροχρωματίνη, τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα έχει να απενεργοποιηθεί. Αυτό υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης ίσως να είναι διαδικασία δύο σταδίων: αρχικά δημιουργείται ένας *πυρήνας πολυμερισμού* (*nucleation centre*) σε μια ειδική αλληλουχία και στη συνέχεια η ανενεργή δομή *εξαπλώνεται* (*propagates*) κατά μήκος του ινιδίου της χρωματίνης. Το μήκος της περιοχής που απενεργοποιείται δεν είναι προκαθορισμένο και μπορεί να είναι τυχαίο, καθώς επηρεάζεται από παραμέτρους όπως οι περιορισμένες ποσότητες συγκεκριμένων πρωτεϊνικών συστατικών που είναι διαθέσιμες εντός του πυρήνα. Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει την όλη διαδικασία είναι η ενεργοποίηση των υποκινητών της συγκεκριμένης περιοχής, με την έννοια ότι ένας ενεργός υποκινητής μπορεί να εμποδίζει την εξαπλωση της ετεροχρωματίνης.

Τα γονίδια που βρίσκονται πολύ κοντά στην ετεροχρωματίνη είναι πιο πιθανό να απενεργοποιηθούν και επομένως θα είναι ανενεργά σε μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, τα όρια της ετεροχρωματίνης μπορεί να καθορίζονται από την εξάντληση των διαθέσιμων πρωτεϊνών που απαιτούνται για την εξαπλώσή της.

Το φαινόμενο της **τελομερικής αποσιώπησης** (*telomeric silencing*) στη ζύμη είναι ανάλογο με την ποικιλότητα λόγω θέσης στην *Drosophila*, μια και τα γονίδια που μετατοπίζονται σε μια τελομερική τοποθεσία παρουσιάζουν την ίδια ποικιλόμορφη απώλεια της λειτουργίας τους. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί απόρροια της εξαπλώσης της ετεροχρωματίνης, αυτή τη φορά από τα τελομερή.

Στη ζύμη βρίσκουμε και μια δεύτερη μορφή γονιδιακής αποσιώπησης. Ο συζευκτικός τύπος της ζύμης καθορίζεται από έναν ενεργό γενετικό τόπο (*MAT*), αλλά το γονιδίωμα του οργανισμού περιέχει δύο επιπλέον αντίγραφα αλληλουχιών που σχετίζονται με το συζευκτικό τύπο (*HML* και *HMR*), τα οποία διατηρούνται σε ανενεργή μορφή. Οι σιωπηλοί γενετικοί τόποι *HML* και *HMR* έχουν πολλές κοινές ιδιότητες με την ετεροχρωματίνη και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως περιοχές ετεροχρωματίνης πολύ μικρού μεγέθους (βλ. 18.7: *Οι σιωπηλές κασέτες στους HML και HMR είναι υπό καταστολή*).



Εικόνα 23.20 Η εξαπλωση της ετεροχρωματίνης απενεργοποιεί τα παρακείμενα γονίδια. Η πιθανότητα να απενεργοποιηθεί ένα γονίδιο εξαρτάται από την απόσταση που το χωρίζει από τον πυρήνα πολυμερισμού της ετεροχρωματίνης. Το μάτι της *Drosophila*, όταν το γονίδιο *white* είναι ενεργό χρωματίζεται κόκκινο. Στις περιοχές που σχηματίζονται από κύτταρα στα οποία το γονίδιο αυτό έχει απενεργοποιηθεί, το μάτι εμφανίζεται λευκό.

23.14 Οι πρωτεΐνες που τροποποιούν τη χρωματίνη έχουν ορισμένα κοινά μοτίβα

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η χρωμοεπικράτεια απαντάται σε διάφορες πρωτεΐνες που έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση.
- ▶ Η επικράτεια SET αποτελεί τμήμα του ενεργού κέντρου των μεθυλοτρανσφερασών.

Οι γνώσεις μας σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη δομή της χρωματίνης προήλθαν από τη μελέτη γονιδίων των οποίων οι μεταλλαγές επηρεάζουν την ποικιλότητα λόγω θέσης. Έχουν αναγνωριστεί περίπου 30 τέτοια γονίδια στην *Drosophila*. Όσα από αυτά κωδικοποιούν προϊόντα που καταστέλλουν την ποικιλότητα ονομάζονται *Su(var)*, ενώ όσα κωδικοποιούν προϊόντα που ενισχύουν την ποικιλότητα αναφέρονται ως *E(var)*. Υπενθυμίζεται, βέβαια, ότι τα γονίδια ονομάστηκαν έτσι με βάση τη συμπεριφορά των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων που έχουν χαρακτηριστεί. Οι μεταλλάξεις που καταστέλλουν την ποικιλότητα βρίσκονται σε γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στο σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Αυτά περιλαμβάνουν ένζυμα που επιδρούν στη χρωματίνη, όπως είναι οι απακετυλάσες των ιστονών, καθώς και πρωτεΐνες που εντοπίζονται πάνω στην ετεροχρωματίνη. Οι μεταλλάξεις που ενισχύουν την ποικιλότητα εντοπίζονται σε γονίδια των οποίων τα προϊόντα απαιτούνται για την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Τυπικά, σε αυτά περιλαμβάνονται μέλη του συμπλόκου SWI/SNF. Παρατηρώντας αυτές τις ιδιότητες, γίνεται αμέσως αντιληπτό ότι η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης είναι σημαντική για τον έλεγχο του σχηματισμού της ετεροχρωματίνης. Οι παραπάνω γενετικοί τόποι έχουν ομολογούς τους στη ζύμη, γεγονός που καταδεικνύει την καθολικότητα των μηχανισμών αυτών. Ορισμένοι από αυτούς τους ομολογούς γενετικούς τόπους στον *S. pombe* είναι τα γονίδια *clr* (cryptic loci regulator, ρυθμιστής αινιγματικών τόπων), οι μεταλλάξεις των οποίων επηρεάζουν την αποσιώπηση.

Πολλές από τις πρωτεΐνες *Su(var)* και *E(var)* έχουν ένα κοινό πρωτεϊνικό μοτίβο 60 αμινοξέων που ονομάζεται χρωμοεπικράτεια (chromo domain). Το γεγονός ότι το μοτίβο αυτό εντοπίζεται σε πρωτεΐνες και των δύο ομάδων υποδηλώνει ότι συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη και ότι αναγνωρίζει συγκεκριμένους στόχους πάνω στη χρωματίνη.

Μεταξύ των πρωτεϊνών *Su(var)* είναι η HP1 (Heterochromatin Protein 1, ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1). Αναγνωρίστηκε αρχικά ως μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη, χρωματίζοντας πολυταινικά χρωμοσώματα με ένα ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα. Αργότερα αποδείχθηκε ότι αποτελεί προϊόν του γονιδίου *Su(var)2-5*. Η ομόλογη πρωτεΐνη στη ζύμη *S. pombe* κωδικοποιείται από το γονίδιο *swi6*. Η HP1 φέρει μία χρωμοεπικράτεια κοντά την N-τελική περιοχή και μία άλλη συγγενική επικράτεια, που ονομάζεται σκιά της χρωμοεπικράτειας (chromo-shadow domain), στο C-τελικό άκρο (βλ. Εικόνα 23.23). Η σημασία της χρωμοεπικράτειας υποδεικνύεται από το γεγονός ότι σ'

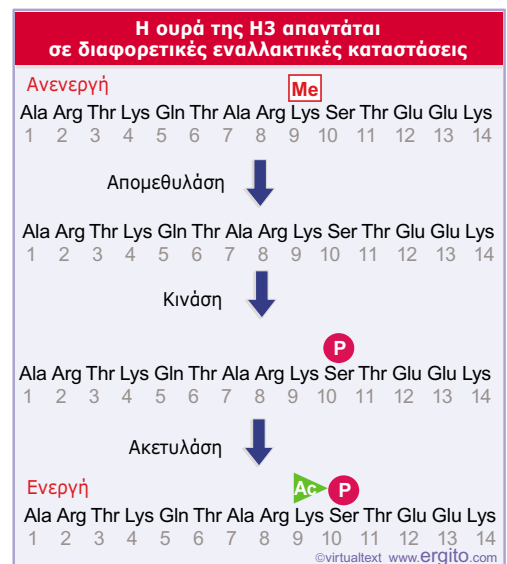
αυτήν έχουν εντοπιστεί πολλές από τις μεταλλάξεις της HP1. Οι χρωμοεπικράτειες ευθύνονται για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στην ετεροχρωματίνη. Διαδραματίζουν παρόμοιο ρόλο και σε άλλες πρωτεΐνες, αν και οι χρωμοεπικράτειες από διαφορετικές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ποικίλλουν ως προς την επιμέρους εξειδίκευση στην αναγνώριση των στόχων τους και να καθοδηγούν τις πρωτεΐνες είτε στην ετεροχρωματίνη είτε στην ευχρωματίνη. Η αρχική πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως HP1 τώρα ονομάζεται HP1α, αφού από τότε έχουν ανακαλυφθεί δύο ακόμη συγγενικές πρωτεΐνες, οι HP1β και HP1γ.

Η Su(var)3-9 έχει μία χρωμοεπικράτεια, καθώς και μία επικράτεια SET, ένα μοτίβο που εντοπίζεται σε αρκετές πρωτεΐνες αυτού του τύπου. Η ομόλογή της πρωτεΐνη στα θηλαστικά εντοπίζεται στην κεντρομερική ετεροχρωματίνη. Πρόκειται για τη μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών, η οποία επιδρά στο κατάλοιπο ⁹Lys της ιστόνης H3 (βλ. 23.9: *Η μεθυλίωση των ιστονών σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA*). Η επικράτεια SET είναι τμήμα του ενεργού κέντρου της μεθυλοτρανσφεράσης και η παρουσία της σε μια πρωτεΐνη αποτελεί δείκτη ενεργότητας μεθυλοτρανσφεράσης.

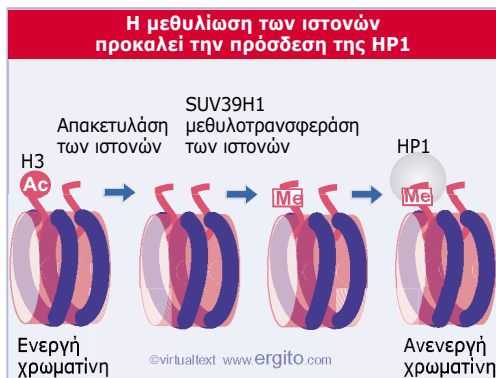
Η επικράτεια bromo εντοπίζεται σε μια ποικιλία πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών. Από τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής της αποδείχθηκε ότι αποτελεί θέση πρόσδεσης για ακετυλιωμένη λυσίνη. Η επικράτεια bromo από μόνη της αναγνωρίζει μόλις μια μικρή αλληλουχία 4 αμινοξέων, η οποία περιλαμβάνει την ακετυλιωμένη λυσίνη. Επομένως η ειδικότητα αναγνώρισης του στόχου θα πρέπει να εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις που εμπλέκουν και άλλες περιοχές. Εκτός από τις ακετυλοτρανσφεράσες, η επικράτεια bromo απαντάται επίσης σε ένα ευρύ φάσμα άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων συστατικών της μεταγραφικής συσκευής. Αυτό υποδηλώνει ότι χρησιμεύει για την αναγνώριση ακετυλιωμένων ιστονών, γεγονός που σημαίνει ότι είναι πολύ πιθανό να απαντάται σε πρωτεΐνες οι οποίες ενέχονται στη γονιδιακή ενεργοποίηση.

Παρόλο που γενικά η ενεργή χρωματίνη σχετίζεται με την ακετυλίωση ενώ η ανενεργή χρωματίνη με τη μεθυλίωση των ιστονών, παρατηρούνται ορισμένες εξαιρέσεις στον κανόνα. Η πιο καλά χαρακτηρισμένη από αυτές είναι η ακετυλίωση του καταλοίπου ¹²Lys της H4, η οποία σχετίζεται με την ετεροχρωματίνη.

Μια ιστονική ουρά μπορεί να υποστεί πολλαπλές τροποποιήσεις, ενώ η μία τροποποίηση μπορεί να επηρεάζει την άλλη. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση μιας λυσίνης σε κάποια θέση μπορεί να είναι απαραίτητη για την ακετυλίωση μιας άλλης λυσίνης σε κάποια άλλη θέση. Στην **Εικόνα 23.21** παρουσιάζεται η περίπτωση της ουράς της H3, η οποία μπορεί να βρίσκεται σε δύο εναλλακτικές καταστάσεις. Η ανενεργή κατάσταση φέρει μεθυλο-⁹Lys. Η ενεργή κατάσταση φέρει ακετυλο-⁹Lys και φωσφο-¹⁰Ser. Αυτές οι καταστάσεις μπορούν να εξαπλώνονται σε μεγάλες περιοχές της χρωματίνης. Η φωσφορυλίωση της ¹⁰Ser και η μεθυλίωση της ⁹Lys είναι αμοιβαία ασύμβατες, υποδεικνύοντας τη σειρά των γεγονότων που παρουσιάζονται στην Εικόνα 23.21. Το φαινόμενο των διαδοχικών ιεραρχημένων τροποποιήσεων ίσως ευθύνεται για τη μετατροπή της ουράς από την ενεργή στην ανενεργή μορφή και αντιστρόφως.



Εικόνα 23.21 Η ενεργότητα της χρωματίνης επηρεάζεται από διαφορετικές τροποποιήσεις της ουράς της H3.



Εικόνα 23.22 Η SUV39H1 είναι μια μεθυλο-τρανσφεράση των ιστονών που επιδρά στη ^9Lys της ιστόνης H3. Ακολούθως, η HP1 προσδένεται στη μεθυλιωμένη αυτή ιστόνη.

23.15 Ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις ειδικών πρωτεϊνών με τις ιστόνες

Σημαντικές έννοιες

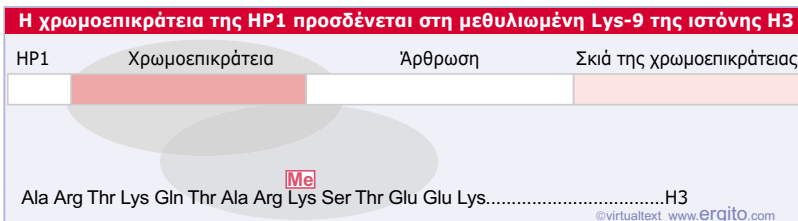
- ▶ Η πρωτεΐνη HP1 είναι καθοριστικής σημασίας για το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης στα θηλαστικά και δρα μέσω της πρόσδεσής της στη μεθυλιωμένη ιστόνη H3.
- ▶ Η RAP1 αρχίζει το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης στη ζύμη, αφού προσδεθεί σε ειδικές αλληλουχίες-στόχους στο DNA.
- ▶ Οι στόχοι της RAP1 περιλαμβάνουν τις τελομερικές επαναλήψεις και τις αλληλουχίες αποσιώπησης στους γενετικούς τόπους *HML* και *HMR*.
- ▶ Η RAP1 στρατολογεί τις πρωτεΐνες SIR3/SIR4, το σύμπλοκο των οποίων αλληλεπιδρά με τις N-τελικές ουρές των H3 και H4.

Η απενεργοποίηση της χρωματίνης προκαλείται από την πρόσδεση πρωτεϊνών στο ινίδιο νουκλεοσωμάτων. Η απενεργοποίηση μπορεί να οφείλεται σε μια ποικιλία επιδράσεων, όπως η συμπίκνωση της χρωματίνης, που εμποδίζει την πρόσβαση της μεταγραφικής συσκευής, και η κατάληψη ρυθμιστικών θέσεων από πρωτεΐνες που είτε παρεμποδίζουν την πρόσδεση ενεργοποιητικών παραγόντων είτε καταστέλλουν άμεσα τη μεταγραφή.

Δύο συστήματα που έχουν χαρακτηριστεί σε μοριακό επίπεδο περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη HP1 στα θηλαστικά και το σύμπλοκο SIR στη ζύμη. Αν και οι πρωτεΐνες των δύο συστημάτων είναι διαφορετικές, ο γενικός μηχανισμός της αντίδρασης είναι παρόμοιος: και στις δύο περιπτώσεις, τα σημεία επαφής με τη χρωματίνη είναι οι N-τελικές ουρές των ιστονών.

Η μετάλλαξη μιας απακετυλάσης που επιδρά στην ακετυλιωμένη ^{14}Lys της H3 παρεμποδίζει τη μεθυλίωση της ^9Lys . Η μεθυλιωμένη στην ^9Lys ιστόνη H3 δεσμεύεται από τη χρωμοεπικράτεια της πρωτεΐνης HP1. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις έχει προταθεί το μοντέλο της **Εικόνας 23.22**, το οποίο περιγράφει πώς γίνεται η έναρξη του σχηματισμού της ετεροχρωματίνης. Αρχικά, η απακετυλάση αφαιρεί την τροποποίηση στη ^{14}Lys . Ακολούθως, η μεθυλοτρανσφεράση SUV39H1 επιδρά στην ουρά της ιστόνης H3, για να δημιουργήσει ένα σήμα μεθυλίωσης στο οποίο προσδένεται η HP1. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 23.23**, η χρωμοεπικράτεια της HP1 αλληλεπιδρά με τη μεθυλιωμένη λυσίνη πυροδοτώντας το σχηματισμό ανενεργής χρωματίνης. Στην **Εικό-**

Εικόνα 23.23 Η μεθυλίωση της ιστόνης H3 δημιουργεί μια θέση πρόσδεσης για την HP1.



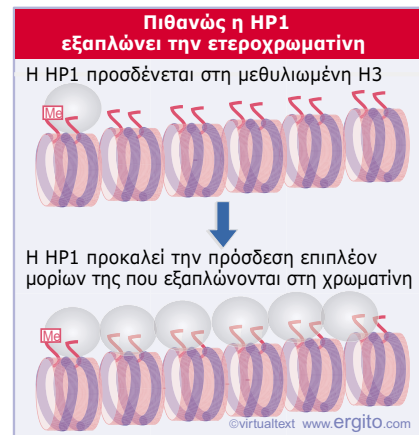
va 23.24 φαίνεται ότι η ανενεργή περιοχή μπορεί στη συνέχεια να εξαπλωθεί λόγω της ικανότητας των μορίων HP1 να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Η ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού γονιδιακής αποσιώπησης στη ζύμη υποδηλώνεται από την εξάρτηση των φαινομένων που οφείλονται στην απενεργοποίηση της χρωματίνης από την ίδια ομάδα γενετικών τόπων. Οι μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα γονίδια αυτής της ομάδας προκαλούν την ενεργοποίηση των *HML* και *HMR*, ενώ αίρουν επίσης την καταστολή γονιδίων που έχουν ενσωματωθεί κοντά στην τελομερική ετεροχρωματίνη. Επομένως τα προϊόντα των συγκεκριμένων γενετικών τόπων διατηρούν σε ανενεργή κατάσταση και τους δύο τύπους ετεροχρωματίνης.

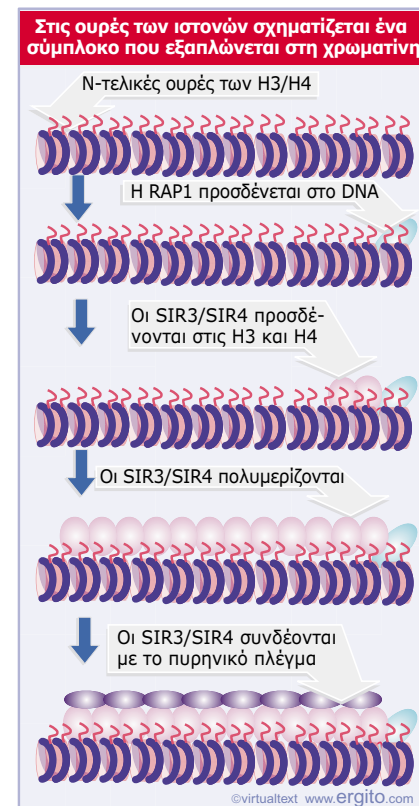
Στην **Εικόνα 23.25** προτείνεται ένα μοντέλο για τη δράση αυτών των πρωτεϊνών. Μόνο μία από αυτές προσδένεται ειδικά στην αλληλουχία του DNA. Πρόκειται για τη RAP1, η οποία προσδένεται στις επαναλήψεις $C_{1-3}A$ των τελομερών, καθώς και στα *cis*-δραστικά στοιχεία αποσιώπησης που απαιτούνται για την καταστολή των *HML* και *HMR*. Οι πρωτεΐνες SIR3 και SIR4 αλληλεπιδρούν τόσο με τη RAP1 όσο και μεταξύ τους (μπορεί να λειτουργούν ως ετεροπολυμερή). Οι SIR3/SIR4 αλληλεπιδρούν εξάλλου και με τις N-τελικές ουρές των ιστονών H3 και H4. Πράγματι, η πρώτη απόδειξη ότι οι ιστόνες μπορεί να ενέχονται άμεσα στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης προήλθε από την ανακάλυψη ότι οι μεταλλάξεις που καταργούν την αποσιώπηση στους τόπους *HML/HMR* ταυτοποιήθηκαν σε γονίδια των ιστονών H3 και H4.

Η RAP1 αναλαμβάνει τον κρίσιμο ρόλο της αναγνώρισης των αλληλουχιών DNA στις οποίες θα σχηματιστεί η ετεροχρωματίνη. Στρατολογεί τις SIR3/SIR4, οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα με τις ιστόνες H3/H4. Μόλις οι SIR3/SIR4 προσδεθούν στις ιστόνες H3/H4, το σύμπλοκο μπορεί να πολυμεριστεί ακόμη περισσότερο και να εξαπλωθεί κατά μήκος του ινιδίου της χρωματίνης. Αυτή η εξάπλωση μπορεί να απενεργοποιεί την περιοχή, είτε επειδή η ίδια η επικάλυψη της χρωματίνης με τις SIR3/SIR4 έχει κατασταλτική επίδραση είτε επειδή η πρόσδεση στις ιστόνες H3/H4 επάγει επιπρόσθετες αλλαγές στη χρωματινική δομή. Δε γνωρίζουμε πώς ελέγχεται η εξάπλωση του συμπλόκου. Το C-τελικό άκρο της SIR3 εμφανίζει ομοιότητες με τις πυρηνικές λαμίνες (συστατικά του πυρηνικού πλέγματος) και μπορεί να ευθύνεται για τη σύνδεση της ετεροχρωματίνης με την πυρηνική περιφέρεια.

Μια παρόμοια σειρά γεγονότων οδηγεί σε αποσιώπηση των γενετικών τόπων *HMR* και *HML* (βλ. επίσης 18.7: *Οι σιωπηλές κασέτες στους HML και HMR είναι υπό καταστολή*). Τρεις παράγοντες που προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες ενέχονται στην έναρξη σχηματισμού του συμπλόκου αποσιώπησης: ο RAP1, ο ABF1 (ένας μεταγραφικός παράγοντας) και το ORC (Origin of Replication Complex, σύμπλοκο έναρξης της αντιγραφής). Σ' αυτή την περίπτωση, η SIR1 προσδένεται σε έναν παράγοντα –ο οποίος αναγνωρίζει μια ειδική αλληλουχία– και στρατολογεί τις SIR2,3,4 ώστε να σχηματιστεί μια κατασταλτική δομή. Η SIR2 είναι μια απακετυλάση ιστονών. Η απακετυλίωση είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πρόσδεσης του συμπλόκου SIR στη χρωματίνη.



Εικόνα 23.24 Η πρόσδεση της HP1 στη μεθυλιωμένη ιστόνη H3 αποτελεί το έναυσμα για την αποσιώπηση της χρωματίνης, επειδή επιπλέον μόρια HP1 προσδένονται διαδοχικά το ένα δίπλα στο άλλο πάνω στη διάταξη των νουκλεοσωμάτων.



Εικόνα 23.25 Ο σχηματισμός της ετεροχρωματίνης αρχίζει όταν η RAP1 προσδένεται στο DNA. Οι SIR3/SIR4 προσδένονται στη RAP1, καθώς και στις ιστόνες H3/H4. Το σύμπλοκο πολυμερίζεται κατά μήκος της χρωματίνης και είναι δυνατόν να συνδέει τα τελομερή με το πυρηνικό πλέγμα.

Με ποιον τρόπο το σύμπλοκο αποσιώπησης απενεργοποιεί τη χρωματίνη; Πιθανόν να συμπυκνώνει τη χρωματίνη, έτσι ώστε οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες να μην μπορούν να εντοπίσουν τους στόχους τους. Στην πιο απλή υποθετική περίπτωση, η παρουσία και μόνο ενός συμπλόκου αποσιώπησης είναι σε θέση να αποκλείει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων και της RNA πολυμεράσης. Η αιτία γι' αυτό θα μπορούσε να είναι είτε ότι τα σύμπλοκα αποσιώπησης παρεμποδίζουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (και έτσι έμμεσα αποτρέπουν την πρόσδεση των παραγόντων σε αυτήν) είτε ότι άμεσα καλύπτουν τις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων πάνω στο DNA. Ωστόσο, η πραγματικότητα ίσως να είναι πιο περίπλοκη, δεδομένου ότι τόσο οι μεταγραφικοί παράγοντες όσο και η RNA πολυμεράση μπορεί να βρεθούν κοντά σε υποκινητές που εδράζονται μέσα σε αποσιωπημένη χρωματίνη. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι το σύμπλοκο αποσιώπησης μάλλον εμποδίζει τη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων παρά την ίδια την πρόσδεσή τους στη χρωματίνη. Μάλιστα, υπάρχει ενδεχόμενο οι ενεργοποιητές των γονιδίων να ανταγωνίζονται τις κατασταλτικές επιδράσεις της χρωματίνης, έτσι ώστε η ενεργοποίηση ενός υποκινητή να καταστέλλει τελικά τη δράση του συμπλόκου αποσιώπησης και την εξάπλωση της ετεροχρωματίνης.

Μια άλλη εξειδικευμένη δομή χρωματίνης σχηματίζεται στα κεντρομερή και αποκαλύφθηκε από τη μελέτη των συνεπειών της μετάλλαξης *cse4* του *S. cerevisiae*, η οποία διαταράσσει τη δομή του κεντρομερούς. Η Cse4p είναι μια πρωτεΐνη συγγενική με την ιστόνη H3. Επίσης, η πρωτεΐνη CENP-A του κεντρομερούς των θηλαστικών έχει παρόμοια αλληλουχία. Οι γενετικές αλληλεπιδράσεις, αφενός ανάμεσα στα *cse4* και *CDE-II*, αφετέρου ανάμεσα στο *cse4* και σε μια μετάλλαξη της ιστόνης H4, υποδηλώνουν ότι το οκταμερές των ιστονών μπορεί να σχηματιστεί γύρω από έναν πυρήνα που αποτελείται από το σύμπλοκο Cse4p-H4, ενώ στη συνέχεια μπορούν να συνδεθούν επιπλέον τα σύμπλοκα CBF1 και CBF3, ώστε να σχηματιστεί η δομή του κεντρομερούς.

Ακολουθώς, το κεντρομερές μπορεί να εμπλακεί στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης στην περιοχή. Σε ανθρώπινα κύτταρα, η ειδική για το κεντρομερές πρωτεΐνη CENP-B απαιτείται για την έναρξη των τροποποιήσεων της ιστόνης H3 (δηλαδή απακετυλίωση των ⁹Lys και ¹⁴Lys και επακόλουθη μεθυλίωση της ⁹Lys), οι οποίες πυροδοτούν τη σύνδεση με την πρωτεΐνη Swi6 κι αυτή με τη σειρά της προωθεί το σχηματισμό ετεροχρωματίνης στην περιοχή.

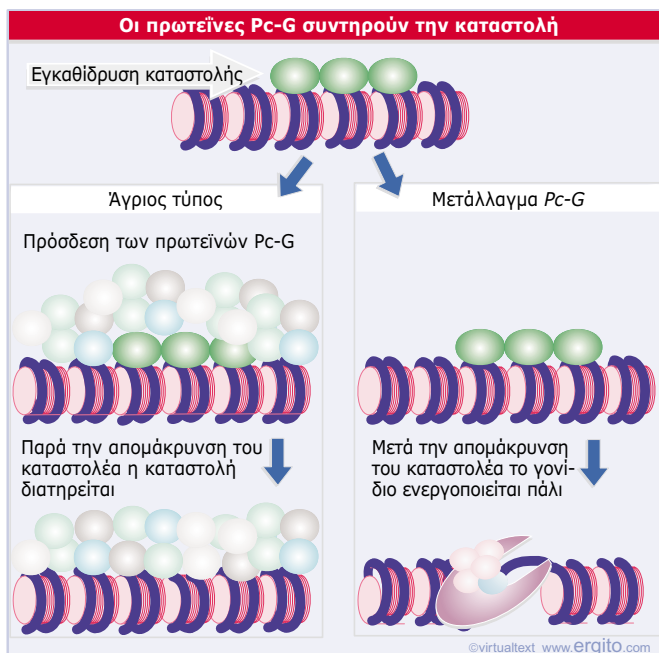
23.16 Οι Polycomb και Trithorax είναι ανταγωνιστικοί καταστολείς και ενεργοποιητές

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb (Pc-G) διαιωνίζουν την καταστολή διαμέσου των κυτταρικών διαιρέσεων.
- ▶ Το στοιχείο PRE είναι μια αλληλουχία DNA που απαιτείται για τη δράση των πρωτεϊνών της ομάδας Pc-G.
- ▶ Το PRE παρέχει ένα κέντρο πολυμερισμού στο οποίο οι πρωτεΐνες της ομάδας Pc-G εγκαθιδρύουν και εξαπλώνουν μια δομή που απενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση.
- ▶ Δεν έχει βρεθεί ακόμη κάποια μεμονωμένη πρωτεΐνη της ομάδας Pc-G που να προσδένεται απευθείας στο PRE.
- ▶ Οι πρωτεΐνες της ομάδας Trithorax ανταγωνίζονται τις δράσεις των πρωτεϊνών της ομάδας Pc-G.

Η ετεροχρωματίνη αποτελεί παράδειγμα ειδικής καταστολής που επάγεται μέσω αλλαγής της χρωματινικής δομής. Ένα άλλο τέτοιο παράδειγμα αποκαλύφθηκε από τη γενετική ανάλυση των ομοιωτικών γονιδίων της *Drosophila*, που οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο διατηρεί ορισμένα γονίδια σε κατάσταση καταστολής. Τα μεταλλάγματα *Pc* (*Polycomb*) εμφανίζουν μεταμορφώσεις του κυτταρικού τύπου, οι οποίες είναι αντίστοιχες με αυτές των μεταλλάξεων κέρδους λειτουργίας των γονιδίων *Antennapedia* (*Antp*) ή *Ultrathorax* (*Ubx*) και οφείλονται στο ότι τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται σε ιστούς όπου κανονικά θα έπρεπε να καταστέλλονται. Το γεγονός αυτό εμπλέκει το γενετικό τόπο *Pc* στη ρύθμιση της μεταγραφής. Το γονίδιο *Pc* είναι το αρχέτυπο μιας κατηγορίας γενετικών τόπων που ονομάζεται ομάδα *Pc* (Pc-G, **P**olycomb-**G**roup). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτής της ομάδας αίρουν την καταστολή των ομοιωτικών γονιδίων, υποδηλώνοντας ότι είναι πιθανό οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb να παίζουν κάποιον κοινό ρυθμιστικό ρόλο. Μια σχέση ανάμεσα στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στη γονιδιακή καταστολή υποδεικνύεται από τις ιδιότητες του γονιδίου της μύγας *brahma* (ομόλογο με το γονίδιο *SWI2*), το οποίο κωδικοποιεί ένα συστατικό του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης SWI/SNF. Η απώλεια της λειτουργίας του *brahma* καταστέλλει τις μεταλλάξεις του *Pc*, άρα φαίνεται πως τα προϊόντα των γονιδίων *brahma* και *Pc* έχουν ανταγωνιστικές δράσεις.

Η πλειοτροπικότητα των μεταλλάξεων *Pc* συνάδει με το γεγονός ότι η *Pc* είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε ~80 θέσεις στα πολυταινικά χρωμοσώματα. Στις θέσεις αυτές περιλαμβάνεται το γονίδιο *Antp*. Ένα άλλο μέλος της Pc-G, το *polyhomeotic*, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε μια ομάδα ζωνών των πολυταινικών χρωμοσωμάτων οι οποίες είναι πανομοιότυπες με εκείνες όπου προσδένεται η *Pc*. Οι δύο πρωτεΐνες συνανοσοκατακρημνίζονται σε ένα σύμπλοκο ~2,5 x 10⁶ Da το οποίο περιέχει 10-15 πολυπεπτίδια. Η σχέση ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες και στα προϊόντα των ~30 γονιδίων Pc-G δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Μια εκδοχή είναι ότι πολλά από αυτά τα πολυπεπτίδια σχηματίζουν ένα γενικό κατα-



Εικόνα 23.26 Οι πρωτεΐνες της ομάδας Pc-G δεν προκαλούν την καταστολή, αλλά είναι υπεύθυνες για τη διατήρησή της.

σταλτικό σύμπλοκο, το οποίο μπορεί να τροποποιείται από κάποια άλλα πολυπεπτίδια, ώστε τελικά να εμφανίζει ειδικότητα για συγκεκριμένους γενετικούς τόπους.

Οι πρωτεΐνες Pc-G δεν είναι συμβατικοί καταστολείς. Δεν καθορίζουν το αρχικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στα οποία επιδρούν. Εάν οι πρωτεΐνες Pc-G απουσιάζουν, τότε αίρεται η καταστολή των γονιδίων-στόχων τα οποία φυσιολογικά θα πρέπει να διατηρούνται ανενεργά μετά το πέρας της λειτουργίας τους (παρόλο που κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης είχαν ενεργοποιηθεί προσωρινά για τις ανάγκες της ρύθμισης της ανάπτυξης του οργανισμού). Αυτό δείχνει ότι οι πρωτεΐνες Pc-G με κάποιον τρόπο αναγνωρίζουν την κατάσταση καταστολής που έχει καθιερωθεί και ευθύνονται για τη διαίωνισή της στα θυγατρικά κύτταρα διαμέσου των διαιρέσεων. Στην **Εικόνα 23.26** παρουσιάζεται ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο οι πρωτεΐνες Pc-G προσδένονται μαζί με έναν καταστολέα στο DNA, αλλά οι πρωτεΐνες Pc-G παραμένουν προσδεσμένες ακόμη και όταν ο καταστολέας απομακρυνθεί. Η πρόσδεση

των πρωτεϊνών Pc-G είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της καταστολής, οπότε, αν αυτές απουσιάσουν, τα γονίδια ενεργοποιούνται εκ νέου.

Η ελάχιστη περιοχή του DNA που είναι απαραίτητη για την επαγωγή της απόκρισης στα προϊόντα των γονιδίων της ομάδας Pc-G ονομάζεται PRE (**P**olycomb **R**esponse **E**lement, στοιχείο απόκρισης στο *Polycomb*). Μπορεί να προσδιοριστεί λειτουργικά από την ιδιότητά του να διατηρεί την καταστολή στη γύρω περιοχή του, σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού. Η πειραματική δοκιμή ύπαρξης στοιχείων PRE σε ένα τμήμα DNA βασίζεται στην κλωνοποίησή του κοντά σε ένα γονίδιο αναφοράς, η έκφραση του οποίου ελέγχεται από έναν ενισχυτή που καταστέλλεται νωρίς κατά την ανάπτυξη. Αν το γονίδιο αναφοράς εκφράζεται στους απογόνους αυτών των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, τότε το κλωνοποιημένο τμήμα δε διαθέτει ιδιότητες PRE. Αντίθετα, ένα αποτελεσματικό PRE θα αποτρέψει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς στα θυγατρικά κύτταρα.

Το PRE είναι μια περίπλοκη αλληλουχία, μεγέθους ~10 kb. Κανένα μέλος της ομάδας Pc-G δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα ότι προσδένεται από μόνο του σε ειδικές θέσεις πάνω στο PRE, επομένως ο μηχανισμός συναρμολόγησης του συμπλόκου παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, όταν ένας γενετικός τόπος καταστέλλεται από πρωτεΐνες Pc-G, αυτές φαίνεται να καλύπτουν μια περιοχή που υπερβαίνει σε μήκος το PRE. Η πρωτεΐνη Polycomb εντοπίζεται τοπικά σε μια έκταση μερικών χιλιάδων ζευγών βάσεων DNA που περιλαμβάνει ένα στοιχείο PRE.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι το PRE ίσως παρέχει ένα κέντρο πολυμερισμού, από το οποίο εξαπλώνεται η ειδική δομή που εξαρτάται από τις πρωτεΐνες Pc-G. Αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται από την παρατήρηση φαινομένων παρόμοιων με την ποικιλότητα λόγω θέσης (βλ. Εικόνα 23.20). Συγκεκριμένα, ένα γονίδιο αναφοράς που βρίσκεται κοντά σε ένα γενετικό τόπο του οποίου η καταστολή διατηρείται από τις πρωτεΐνες Pc-G μπορεί να κληρονομεί-

ται σε ανενεργή κατάσταση σε ορισμένα κύτταρα, ενώ σε άλλα κύτταρα μπορεί να είναι ενεργό. Σε μια τυπική περίπτωση, πειράματα ομοιοπολικής διασύνδεσης *in vivo* έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Pc εντοπίζεται σε μεγάλες περιοχές του συμπλέγματος γονιδίων *bithorax* τα οποία είναι ανενεργά, αλλά δε βρίσκεται σε περιοχές που περιέχουν ενεργά γονίδια. Η άποψη ότι η κατανομή των πρωτεϊνών Pc-G οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών ενός πολυμερούς συμπλόκου ενισχύεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *Pc* οι οποίες επηρεάζουν την κατανομή της πρωτεΐνης και καταργούν την ικανότητα άλλων μελών της ομάδας Pc-G να εντοπίζονται σε περιοχές που φέρουν στοιχεία PRE. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Pc-G στη διατήρηση –και όχι στην καθιέρωση– της καταστολής θα πρέπει να δηλώνει ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου στο PRE εξαρτάται επίσης από τη γονιδιακή έκφραση σε τοπικό επίπεδο.

Η ύπαρξη μιας χρωμοεπικράτειας στην Pc υπαινίσσεται μια σχέση του συμπλόκου Pc-G με γενικότερες αλλαγές στη χρωματίνη. Πράγματι, η χρωμοεπικράτεια αρχικά αναγνωρίστηκε ως μια ομόλογη περιοχή ανάμεσα στην Pc και στην πρωτεΐνη HP1, η οποία εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη. Εφόσον η ποικιλιότητα λόγω θέσης είναι αποτέλεσμα εξάπλωσης της καταστολής από την ιδιοστατική ετεροχρωματίνη προς τις παρακείμενες περιοχές, είναι πιθανό η χρωμοεπικράτεια να χρησιμοποιείται από την Pc και την HP1, ώστε οι πρωτεΐνες αυτές να αλληλεπιδρούν με παράγοντες που επάγουν το σχηματισμό των ετεροχρωματινικών και των ανενεργών δομών (βλ. 23.14: *Οι πρωτεΐνες που τροποποιούν τη χρωματίνη έχουν ορισμένα κοινά μοτίβα*). Αυτό το μοντέλο υπονοεί ότι υπάρχει ενδεχόμενο να χρησιμοποιούνται παρόμοιοι μηχανισμοί τόσο για την καταστολή μεμονωμένων γενετικών τόπων όσο και για το σχηματισμό ετεροχρωματίνης.

Η ομάδα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια της ομάδας *trithorax* (*trxG*, ***trithorax Group***) έχει αντίθετη δράση από αυτήν των πρωτεϊνών Pc-G, δηλαδή διατηρεί τα γονίδια σε ενεργή κατάσταση. Ο τρόπος δράσης των δύο ομάδων μπορεί να εμφανίζει ορισμένες ομοιότητες: για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις ορισμένων γενετικών τόπων εμποδίζουν τη λειτουργία τόσο των Pc-G όσο και των *trx*, υποδηλώνοντας ότι οι μεταλλάξεις αυτές μάλλον επηρεάζουν κάποια συστατικά τα οποία είναι κοινά στο μηχανισμό δράσης και των δύο ομάδων πρωτεϊνών. Ένας παράγοντας που κωδικοποιείται από το γονίδιο *trithorax-like*, γνωστός και ως GAGA, επειδή προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες πλούσιες σε GA, προσδένεται στο PRE. Μάλιστα, οι θέσεις όπου προσδένεται η Pc συμπίπτουν με τις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα GAGA.

Τι ακριβώς σημαίνει αυτό; Ο GAGA πιθανότατα απαιτείται για την πρόσδεση στο DNA παραγόντων ενεργοποίησης, όπως τα μέλη της ομάδας *trxG*. Άραγε χρειάζεται και για την πρόσδεση και την κατασταλτική δράση των πρωτεϊνών Pc-G; Αυτό δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί, αλλά ένα τέτοιο μοντέλο θα απαιτούσε έναν επιπλέον παράγοντα (διαφορετικό από τον GAGA), ο οποίος θα καθόριζε ποιος από τους εναλλακτικούς τύπους συμπλόκου θα στρατολογηθεί στη συνέχεια πάνω στη συγκεκριμένη θέση.

23.17 Τα χρωμοσώματα X υφίστανται τροποποιήσεις σε όλη την έκτασή τους

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Το ένα από τα δύο χρωμοσώματα X απενεργοποιείται τυχαία σε κάθε κύτταρο, κατά την εμβρυογένεση των ευθιρίων θηλαστικών.
- ▶ Σε εξαιρετικές περιπτώσεις όπου υπάρχουν περισσότερα από 2 χρωμοσώματα X στο κύτταρο, απενεργοποιούνται όλα εκτός από ένα.
- ▶ Το κέντρο απενεργοποίησης του X (*Xic*) είναι μια *cis*-δραστική περιοχή στο χρωμόσωμα X, η οποία είναι αναγκαία και ικανή για να διασφαλιστεί ότι μόνο ένα χρωμόσωμα X θα παραμείνει ενεργό.
- ▶ Το *Xic* περιλαμβάνει το γονίδιο *Xist*, το οποίο κωδικοποιεί ένα μόριο RNA που εντοπίζεται μόνο στα απενεργοποιημένα χρωμοσώματα X.
- ▶ Ο μηχανισμός που εμποδίζει τη συσσώρευση του RNA *Xist* στο ενεργό χρωμόσωμα παραμένει άγνωστος.

Ο φυλετικός διμορφισμός θέτει ένα ενδιαφέρον πρόβλημα για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μια και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων X στα θηλυκά και αρσενικά άτομα μπορεί να είναι διαφορετικός. Εάν τα φυλοσύνδετα γονίδια (X-linked genes) εκφράζονταν πάντοτε στα ίδια επίπεδα (δηλαδή ανεξαρτήτως φύλου), τότε τα θηλυκά θα είχαν διπλάσια ποσότητα προϊόντων σε σχέση με τα αρσενικά. Το πόσο σημαντικό είναι να αποφευχθεί μια τέτοια κατάσταση φαίνεται από την ύπαρξη ενός μηχανισμού **αντιστάθμισης της γονιδιακής δόσης** (dosage compensation), ο οποίος εξισώνει το συνολικό επίπεδο έκφρασης των φυλοσύνδετων γονιδίων στα δύο φύλα. Οι μηχανισμοί που απαντώνται στα διάφορα είδη οργανισμών συνοψίζονται στην **Εικόνα 23.27**:

Κατά την αντιστάθμιση της γονιδιακής δόσης μεταβάλλεται η έκφραση του χρωμοσώματος X			
	Θηλαστικά	Μύγες	Σκώληκες
	Αδρανοποιείται το ένα X στα ♀	Διπλασιάζεται η έκφραση του X στα ♂	Υποδιπλασιάζεται η έκφραση των δύο X στα ♀
X			
X			
X			
Y			

Εικόνα 23.27 Διαφορετικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς αντιστάθμισης της γονιδιακής δόσης, προκειμένου να εξισωθεί, η συνολική έκφραση των γονιδίων που εδράζονται στα χρωμοσώματα X, μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων.

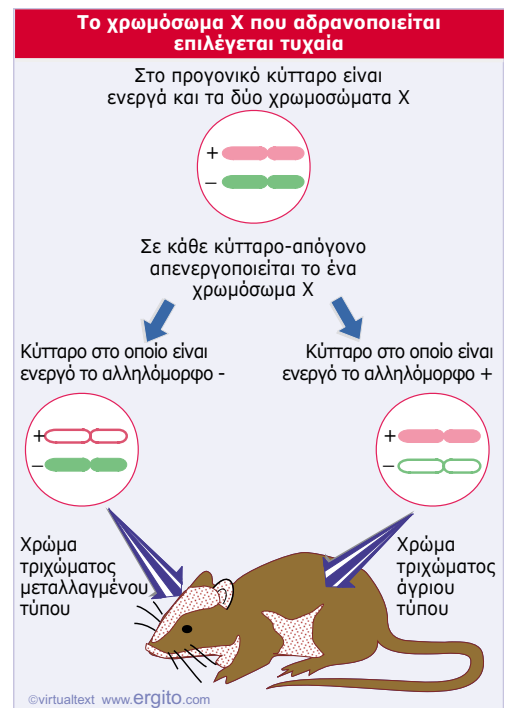
- ▶ Στα θηλαστικά, το ένα από τα δύο χρωμοσώματα X απενεργοποιείται εντελώς στα θηλυκά. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα θηλυκά έχουν μόνο ένα ενεργό χρωμόσωμα X, όπως άλλωστε και τα αρσενικά. Το ενεργό χρωμόσωμα X στα θηλυκά και το μοναδικό χρωμόσωμα X στα αρσενικά εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης.
- ▶ Στην *Drosophila*, το επίπεδο έκφρασης του μοναδικού χρωμοσώματος X στα αρσενικά διπλασιάζεται σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης κάθε χρωμοσώματος X στα θηλυκά.
- ▶ Στο *C. elegans*, το επίπεδο έκφρασης κάθε χρωμοσώματος X στα θηλυκά υποδιπλασιάζεται σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης του μοναδικού χρωμοσώματος X στα αρσενικά.

Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω μηχανισμών αντιστάθμισης της γονιδιακής δόσης είναι ότι *στόχος της ρύθμισης είναι ολόκληρο το χρωμόσωμα X*. Με άλλα λόγια, πραγματοποιείται μια γενικευμένη τροποποίηση που επηρεάζει ποσοτικά την ενεργότητα όλων των υποκινητών του χρωμοσώματος X. Η πλέον καλά μελετημένη περίπτωση είναι η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X στα θηλαστικά, όπου ολόκληρο το χρωμόσωμα καθίσταται ετεροχρωματινικό.

Οι δύο άρρηκτα συνδεδεμένες ιδιότητες της ετεροχρωματινής είναι η συμπυκνωμένη δομή της και η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Η ετεροχρωματίνη μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους:

- ▶ Η **ιδιοστατική ετεροχρωματίνη** (constitutive heterochromatin) περιέχει ειδικές αλληλουχίες που δεν έχουν κωδικό περιεχόμενο. Τυπικά, περιλαμβάνει αλληλουχίες δορυφορικού DNA και απαντάται στα κεντρομερή. Τέτοιες περιοχές είναι πάντοτε ετεροχρωματινικές, εξαιτίας της ίδιας τους της φύσης.
- ▶ Η **εναλλακτική ετεροχρωματίνη** (facultative heterochromatin) εμφανίζεται με τη μορφή τμημάτων ή ακόμα και ολόκληρων χρωμοσωμάτων που, ενώ είναι ανενεργά σε μια κυτταρική σειρά, μπορεί να εκφράζονται σε άλλες σειρές. Το πλέον αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτού του τύπου ετεροχρωματινής αφορά το χρωμόσωμα X των θηλαστικών. Το ανενεργό χρωμόσωμα X παραμένει σε ετεροχρωματινική κατάσταση, από τη μια κυτταρική γενιά στην άλλη, ενώ το ενεργό χρωμόσωμα X αποτελεί μέρος της ευχρωματινής. Επομένως *η ίδια αλληλουχία DNA μπορεί να απαντάται σε οποιαδήποτε από τις δύο καταστάσεις*. Από τη στιγμή που θα καθιερωθεί η ανενεργή κατάσταση, κληρονομείται στα θυγατρικά κύτταρα. Αυτό αποτελεί παράδειγμα επιγενετικής κληρονομικότητας, διότι δεν εξαρτάται από την αλληλουχία του DNA.

Η βασική αντίληψή μας για την κατάσταση του χρωμοσώματος X στα θηλυκά άτομα θηλαστικών διαμορφώθηκε μετά τη διατύπωση της **υπόθεσης του μοναδικού X** (single X hypothesis) το 1961. Θηλυκοί ποντικοί ετερόζυγοι για μεταλλάξεις ενός φυλοσύνδετου γονιδίου που καθορίζει το χρώμα του τριχώματος παρουσιάζουν ποικιλόμορφο φαινότυπο (μωσαϊκό φαινότυπο), δηλαδή ορισμένες περιοχές του τριχώματός τους φέρουν χρώμα άγριου τύπου ενώ άλλες χρώμα μεταλλαγμένου τύπου. Στην **Εικόνα 23.28** εξηγείται ότι αυτό είναι δυνατόν να συμβαίνει *εάν το ένα από τα δύο χρωμοσώματα X απενεργοποιείται με τυχαίο τρόπο σε κάθε κύτταρο ενός μικρού πληθυσμού προγονικών κυττάρων*. Κύτταρα στα οποία απενεργοποιείται το χρωμόσωμα X που φέρει το γονίδιο του άγριου τύπου δίνουν απογόνους που εκφράζουν μόνο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, το οποίο εδράζεται πάνω στο ενεργό χρωμόσωμα X. Αντίθετα, κύτταρα που προέρχονται από κάποιο προγονικό κύτταρο στο οποίο είχε απενεργοποιηθεί το μεταλλαγμένο χρωμόσωμα X εκφράζουν το ενεργό γονίδιο άγριου τύπου. Όταν ο φαινότυπος που εξετάζεται είναι το χρώμα του τριχώματος, τότε τα κύτταρα που προέρχονται από ένα συγκεκριμένο πρόγονο παραμένουν κοντά το ένα στο άλλο, σχηματίζοντας μια περιοχή τριχώματος με το ίδιο χαρακτηριστικό χρώμα. Έτσι δημιουργείται ένα ορατό πρότυπο ποικιλομορφίας. Σε άλλες περιπτώσεις, μεμονωμένα κύτταρα ενός πληθυσμού εκφράζουν αποκλειστικά το ένα ή το άλλο φυλοσύνδετο αλληλόμορφο, οπότε, για παράδειγμα, οι ετεροζυγώτες του φυλοσύνδετου γενετικού τόπου G6PD εκφράζουν σε κάθε ερυθροκύτταρό τους το ένα μόνο από τα δύο αλληλόμορφα. Στο σύνολό τους, ωστόσο, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν εξίσου και τα δύο αλληλόμορφα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X συμβαίνει κατά τυχαίο τρόπο μόνο στα ευθήρια θηλαστικά. Στα μαρσιποφόρα, η επιλογή είναι κατευθυνόμενη, δηλαδή απενεργοποιείται πάντα το χρωμόσωμα X που κληρονομείται από τον πατέρα.



Εικόνα 23.28 Η φυλοσύνδετη ποικιλομορφία προκύπτει λόγω τυχαίας απενεργοποίησης διαφορετικού χρωμοσώματος X σε κάθε προγονικό κύτταρο. Κύτταρα στα οποία το ενεργό χρωμόσωμα X φέρει το αλληλόμορφο + έχουν φαινότυπο άγριου τύπου, ενώ κύτταρα στα οποία το ενεργό χρωμόσωμα X φέρει το αλληλόμορφο - εκδηλώνουν το μεταλλαγμένο φαινότυπο.



Εικόνα 23.29 Ο μηχανισμός απενεργοποίησης του X βασίζεται στη σταθεροποίηση του RNA του *Xist*, το οποίο καλύπτει το ανενεργό χρωμόσωμα.

Η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X στα θηλυκά διέπεται από τον **κανόνα n-1** (n-1 rule), δηλαδή, ανεξάρτητα από τον αριθμό των χρωμοσωμάτων X που υπάρχουν σε ένα κύτταρο, θα απενεργοποιηθούν όλα εκτός από ένα. Στα φυσιολογικά θηλυκά υπάρχουν 2 χρωμοσώματα X, αλλά σε σπάνιες περιπτώσεις όπου ο μη αποχωρισμός δημιουργεί καρυότυπο 3X (ή περισσότερα) παραμένει ενεργό μόνο ένα χρωμόσωμα X. Αυτό το φαινόμενο υποδηλώνει ότι υπάρχει κάποια ειδική ρύθμιση που περιορίζεται σε ένα μόνο χρωμόσωμα X, προστατεύοντάς το από το μηχανισμό απενεργοποίησης που επιδρά σε όλα τα υπόλοιπα χρωμοσώματα X.

Για την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X απαιτείται μόνο ένας γενετικός τόπος, ο οποίος βρίσκεται στο χρωμόσωμα αυτό. Όταν συμβαίνει μετατόπιση ανάμεσα στο X και σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα, ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος είναι παρών μόνο στο ένα από τα δύο προϊόντα της αμοιβαίας ανταλλαγής και μόνο αυτό το προϊόν μπορεί να απενεργοποιηθεί. Αναλύοντας το εύρος διαφόρων περιοχών του X που μετατοπίζονται κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτή η χαρτογράφηση του συγκεκριμένου γενετικού τόπου, ο οποίος ονομάζεται *Xic* (**X**-inactivation center, κέντρο απενεργοποίησης του X). Έχει κλωνοποιηθεί μια περιοχή 450 kb η οποία διαθέτει όλες τις ιδιότητες του *Xic*. Σε ένα σύστημα κυτταροκαλλιέργειας, όταν αυτή η αλληλουχία εισαχθεί ως διαγονίδιο σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα, τότε αυτό το χρωμόσωμα υφίσταται απενεργοποίηση.

Ο *Xic* είναι ένας *cis*-δραστικός γενετικός τόπος, ο οποίος περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την καταμέτρηση των χρωμοσωμάτων X και την απενεργοποίηση όλων των αντιγράφων εκτός από ένα. Η απενεργοποίηση εξαπλώνεται από τον *Xic* κατά μήκος ολόκληρου του χρωμοσώματος X. Όταν ο *Xic* μεταφέρεται με μετατόπιση από ένα X σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα, τότε η απενεργοποίηση εξαπλώνεται και στις αυτοσωμικές περιοχές (αν και η μετατροπή δεν είναι πάντοτε πλήρης).

Ο *Xic* περιέχει ένα γονίδιο, το *Xist* (**X** inactive specific transcript, μετάγραφο ειδικό για το ανενεργό X), το οποίο εκφράζεται μόνο στο ανενεργό χρωμόσωμα X. Η συμπεριφορά αυτού του γονιδίου είναι ακριβώς η αντίστροφη όλων των άλλων γενετικών τόπων του χρωμοσώματος X, οι οποίοι απενεργοποιούνται. Τα ελλείμματα του *Xist* αποτρέπουν την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X. Ωστόσο, δεν έχουν επιπτώσεις στο μηχανισμό καταμέτρησης, αφού τα υπόλοιπα χρωμοσώματα X μπορούν να απενεργοποιηθούν. Διακρίνουμε, δηλαδή, δύο χαρακτηριστικά του *Xic*: αφενός φέρει ένα ή περισσότερα άγνωστα στοιχεία που απαιτούνται για την καταμέτρηση των χρωμοσωμάτων X και αφετέρου περιλαμβάνει το γονίδιο *Xist*, που είναι απαραίτητο για την απενεργοποίηση.

Στην **Εικόνα 23.29** παρουσιάζεται ο ρόλος του RNA του *Xist* στην απενεργοποίηση του X. Το *Xist* κωδικοποιεί ένα RNA που δε φέρει ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια. Το RNA του *Xist* «καλύπτει» το χρωμόσωμα X από το οποίο συντέθηκε, υποδηλώνοντας ότι έχει δομικό ρόλο. Πριν από την απενεργοποίηση του X, συντίθεται και από τα δύο χρωμοσώματα X των θηλυκών. Μετά την απενεργοποίηση, όμως, εντοπίζεται αποκλειστικά πάνω στο απενεργοποιημένο χρωμόσωμα X. Ο ρυθμός της μεταγραφής του *Xist*, πριν και αμέσως μετά από την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, παραμένει σταθερός, γεγονός

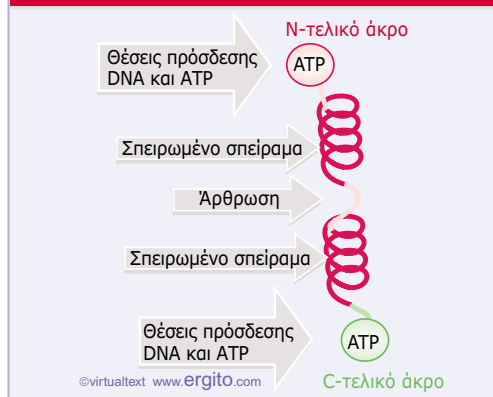
που σημαίνει ότι η ρύθμιση της απενεργοποίησης του X εξαρτάται από μετα-μεταγραφικά φαινόμενα.

Πριν από την απενεργοποίηση του X, το RNA *Xist* αποσυντίθεται σχετικά γρήγορα (χρόνος ημιζωής ~2 hr). Η απενεργοποίηση του X πραγματοποιείται μέσω σταθεροποίησης του RNA *Xist* πάνω στο χρωμόσωμα X που απενεργοποιείται. Το RNA *Xist* εμφανίζει διάστικτη κατανομή κατά μήκος του χρωμοσώματος X, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν η σύνδεσή του με ειδικές δομικές πρωτεΐνες να σταθεροποιεί τη δομή του. Δεν είναι ακόμη γνωστό ποιοι άλλοι παράγοντες ενδεχομένως ενέχονται σε αυτήν την αντίδραση και με ποιον τρόπο η εξάπλωση του RNA *Xist* περιορίζεται στο χρωμόσωμα από το οποίο συντίθεται (δηλαδή είναι *cis*-δραστικό). Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του απενεργού χρωμοσώματος X, που περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση των αλληλουχιών CpG (βλ. 21.19: *Οι νησίδες CpG αποτελούν στόχο ρύθμισης*) και την απουσία ακετυλίωσης της ιστόνης H4, πιθανότατα διαμορφώνονται αργότερα από το μηχανισμό απενεργοποίησης.

Ο κανόνας n-1 υπαινίσσεται ότι η σταθεροποίηση του RNA *Xist* είναι το προκαθορισμένο πρόγραμμα (default) και ότι κάποιος άλλος ειδικός μηχανισμός θα πρέπει να παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή σε ένα μόνο από τα χρωμοσώματα X (το οποίο τελικά θα παραμείνει ενεργό). Αυτό σημαίνει ότι, μολονότι η ύπαρξη του *Xic* είναι αναγκαία και ικανή συνθήκη για την *απενεργοποίηση* ενός χρωμοσώματος X, τα προϊόντα άλλων γενετικών τόπων ίσως είναι απαραίτητα για την *καθιέρωση ενός ενεργού* χρωμοσώματος X.

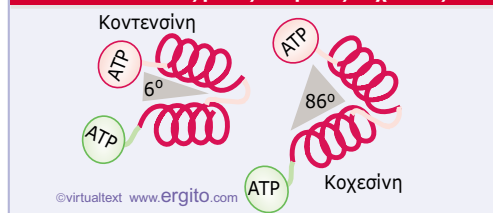
Τελικά, στο ενεργό X απαιτείται η αποσιώπηση της έκφρασης του *Xist*. Έλλειμμα του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης του DNA εμποδίζει την αποσιώπηση του *Xist*, πιθανότατα επειδή η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την απενεργοποίηση της μεταγραφής.

Οι πρωτεΐνες SMC φέρουν σπειρωμένα σπειράματα



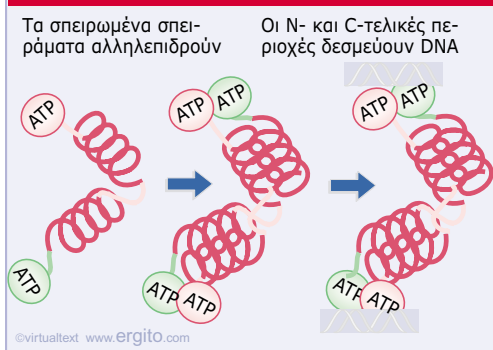
Εικόνα 23.30 Μια πρωτεΐνη SMC αποτελεί μια «μονάδα κίνησης» («walker module») που φέρει μοτίβα δέσμευσης ATP και πρόσδεσης στο DNA σε κάθε άκρο της, συνδεδεμένα με σπειρωμένα σπειράματα που ενώνονται μέσω μιας περιοχής άρθρωσης.

Οι κοντενσίνες μοιάζουν με τις κοχεσίνες



Εικόνα 23.31 Οι δύο βραχίονες μιας κοντενσίνης αναδιπλώνονται σε γωνία 6°. Οι κοχεσίνες έχουν πιο ανοικτή στερεοδιαμόρφωση, με γωνία 86° ανάμεσα στους δύο βραχίονές τους.

Οι κοχεσίνες σχηματίζουν διμερή που μπορούν να συνδέσουν δύο διαφορετικά μέρη DNA



Εικόνα 23.32 Οι πρωτεΐνες SMC διμερίζονται με αντιπαράλληλες αλληλεπιδράσεις των κεντρικών σπειρωμένων σπειραμάτων τους. Και τα δύο άκρα κάθε υπομονάδας έχουν μοτίβα δέσμευσης ATP και πρόσδεσης στο DNA. Οι κοχεσίνες μπορούν να σχηματίζουν μια εκτεταμένη δομή που επιτρέπει τη σύνδεση δύο διαφορετικών μορίων DNA.

23.18 Η χρωμοσωμική συμπύκνωση προκαλείται από τις κοντενσίνες

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Οι πρωτεΐνες SMC είναι ATPάσες και περιλαμβάνουν τις κοντενσίνες και τις κοχεσίνες.
- ▶ Ένα ετεροδιμερές πρωτεϊνών SMC συνδέεται με άλλες υπομονάδες.
- ▶ Οι κοντενσίνες συμπυκνώνουν τη χρωματίνη, εισάγοντας θετικές υπερελικώσεις στο DNA.
- ▶ Οι κοντενσίνες ευθύνονται για τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση.
- ▶ Ειδικές κοντενσίνες ευθύνονται για τη συμπύκνωση των ανενεργών χρωμοσωμάτων X στο *C. elegans*.

Η δομή ολόκληρων χρωμοσωμάτων επηρεάζεται από τη δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας **SMC** (**S**tructural **M**aintenance of **C**hromosome, διατήρηση της χρωμοσωμικής δομής). Πρόκειται για ATPάσες που κατατάσσονται σε δύο λειτουργικές ομάδες. Οι **κοντενσίνες** (condensins) ελέγχουν τη γενική δομή των χρωμοσωμάτων και ευθύνονται για τη συμπύκνωσή τους σε συμπαγείς δομές κατά τη μίτωση. Οι **κοχεσίνες** (cohesins) ενέχονται στη σύνδεση των αδελφών χρωματίδων μεταξύ τους, οι οποίες αποχωρίζονται προς το τέλος της μίτωσης (βλ. 29.19: *Οι κοχεσίνες συγκρατούν μαζί τις αδελφές χρωματίδες*). Και οι δύο παραπάνω ομάδες αποτελούνται από διμερή των πρωτεϊνών SMC. Οι κοντενσίνες σχηματίζουν σύμπλοκα των οποίων ο πυρήνας αποτελείται από το ετεροδιμερές SMC2-SMC4 και συνδέεται με άλλες (μη SMC) πρωτεΐνες. Οι κοχεσίνες έχουν παρόμοια οργάνωση, αλλά ο πυρήνας τους αποτελείται από το ετεροδιμερές SMC1-SMC3.

Στην **Εικόνα 23.30** φαίνεται ότι στο μέσο της κάθε πρωτεΐνης SMC έχει δομή σπειρωμένου σπειράματος (coiled coil), η οποία διακόπτεται από μια ευλύγιστη περιοχή που λειτουργεί ως άρθρωση. Τόσο το N-τελικό όσο και το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης διαθέτει μοτίβα δέσμευσης ATP και πρόσδεσης στο DNA. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για τις δράσεις αυτών των πρωτεϊνών, ανάλογα με το αν διμερίζονται με ενδο- ή δια-μοριακές αλληλεπιδράσεις.

Πειράματα με βακτηριακά ομόλογα των πρωτεϊνών SMC έδειξαν ότι το διμερές σχηματίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης αντιπαράλληλων σπειρωμένων σπειραμάτων, έτσι ώστε το N-τελικό άκρο της μίας υπομονάδας να συνδέεται με το C-τελικό άκρο της άλλης υπομονάδας. Η ύπαρξη της ευλύγιστης άρθρωσης πιθανόν να επιτρέπει στις κοχεσίνες και στις κοντενσίνες να εκμεταλλεύονται διαφορετικούς τρόπους δράσης του διμερούς. Στην **Εικόνα 23.31** φαίνεται ότι οι κοχεσίνες έχουν δομή μορφής V, με τους βραχίονές τους σε γωνία 86°, ενώ οι κοντενσίνες αναδιπλώνονται πιο σφιχτά, με γωνία βραχίωνων μόλις 6°. Αυτό διευκολύνει τις κοχεσίνες να συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες μαζί, ενώ, αντίθετα, οι κοντενσίνες συμπυκνώνουν το χρωμόσωμα. Στην **Εικόνα 23.32** φαίνεται ότι μια κοχεσίνη μπορεί να πάρει τη μορφή ενός εκτεταμένου διμερούς που συνδέει

δύο μόρια DNA. Στην **Εικόνα 23.33** φαίνεται ότι μια κοντενσίνη μπορεί να πάρει τη μορφή V ενός διμερούς –που ουσιαστικά λυγίζει στην άρθρωση– φέρνοντας κοντά δύο απομακρυσμένες θέσεις πάνω στο ίδιο μόριο DNA, προκαλώντας τη συμπύκνωσή του.

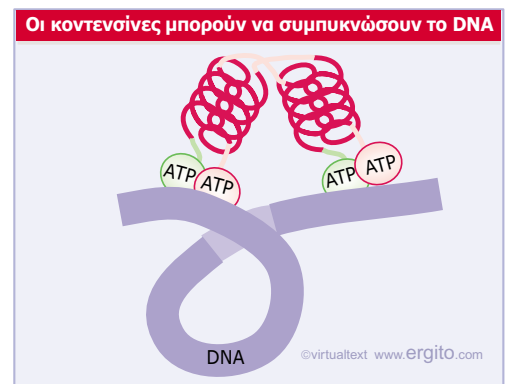
Ένα εναλλακτικό μοντέλο προκύπτει από πειράματα που δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες της ζύμης διμερίζονται με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, δηλαδή ότι σχηματίζεται ένα ομοδιμερές αποκλειστικά από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε δύο όμοιες υπομονάδες. Τα διμερή δύο διαφορετικών πρωτεϊνών (σε αυτή την περίπτωση, των SMC1 και SMC3) μπορούν στη συνέχεια να αλληλεπιδράσουν τόσο στις περιοχές της κεφαλής όσο και των αρθρώσεων τους, ώστε να σχηματίσουν μια κυκλική δομή, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.34**. Αντί να προσδένεται άμεσα στο DNA, μια τέτοια δομή θα μπορούσε να συγκρατεί δύο μόρια DNA σχηματίζοντας ένα δακτύλιο γύρω τους.

Η παρατήρηση των μιτωτικών χρωμοσωμάτων δείχνει ότι οι κοντενσίνες εντοπίζονται σε ολόκληρο το μήκος του χρωμοσώματος, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 23.35**. Αντίθετα, οι κοχεσίνες εντοπίζονται σε διακριτές θέσεις (βλ. Εικόνα 29.34).

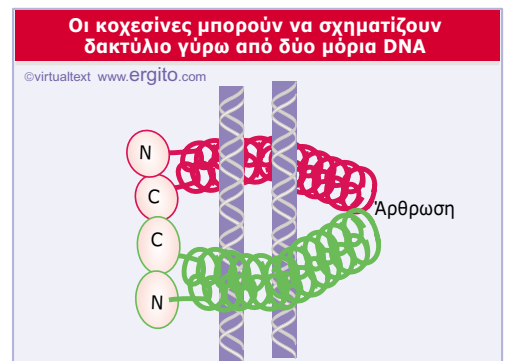
Οι κοντενσίνες πήραν το όνομά τους από την ικανότητα των συμπλόκων τους να συμπυκνώνουν τη χρωματίνη *in vitro*. Παρουσία τοποϊσομεράσης I, τα σύμπλοκά τους είναι ικανά να εισάγουν θετικές υπερελικώσεις στο DNA υδρολύοντας ATP. Η ικανότητά τους αυτή ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης των μη SMC υπομονάδων, η οποία συμβαίνει κατά τη μίτωση. Δεν είναι ακόμη γνωστό πώς αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με άλλες τροποποιήσεις της χρωματίνης, για παράδειγμα με τη φωσφορυλίωση των ιστονών. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου των κοντενσινών αποκλειστικά κατά τη μίτωση καθιστά αμφίβολο το ενδεχόμενο να ενέχεται και στο σχηματισμό της μεσοφασικής ετεροχρωματίνης.

Γενικευμένες αλλαγές της δομής του χρωμοσώματος συμβαίνουν και σε άλλους τύπους αντιστάθμισης της γονιδιακής δόσης. Στην *Drosophila* υπάρχει ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X των αρσενικών. Στο *C. elegans*, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο συνδέεται και με τα δύο χρωμοσώματα X στα έμβρυα XX, αλλά στους πυρήνες των εμβρύων XO τα πρωτεϊνικά συστατικά του συμπλόκου αυτού εμφανίζουν διάχυτη κατανομή. Ο πυρήνας του πρωτεϊνικού συμπλόκου αποτελείται από πρωτεΐνες SMC. Το σύμπλοκο είναι όμοιο με αυτά των κοντενσινών που συνδέονται με τα μιτωτικά χρωμοσώματα σε άλλα είδη. Αυτό δείχνει ότι ο ρόλος του είναι να συμπυκνώνει το χρωμόσωμα σε σχετικά συμπαγή, ανενεργή κατάσταση. Για την κατανομή του συμπλόκου σε όλο το μήκος του χρωμοσώματος X είναι πιθανόν να απαιτούνται πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης.

Επομένως οι αλλαγές που επηρεάζουν όλα τα γονίδια ενός χρωμοσώματος, είτε αρνητικά (στα θηλαστικά και στο *C. elegans*) είτε θετικά (στην *Drosophila*), αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της αντιστάθμισης της γονιδιακής δόσης. Ωστόσο, τα στοιχεία που συνιστούν τη συσκευή αντιστάθμισης της γονιδιακής δόσης, καθώς και οι τρόποι με τους οποίους αυτά εντοπίζονται πάνω στο χρωμόσωμα μπορεί να ποικίλλουν. Φυσικά, σε κάθε περίπτωση ο μηχανισμός δράσης είναι διαφορετικός.



Εικόνα 23.33 Οι κοντενσίνες μπορούν να λυγίζουν στην άρθρωσή τους, προκαλώντας έτσι τη συμπύκνωση του DNA.



Εικόνα 23.34 Οι κοχεσίνες μπορούν να διμεριστούν με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και να σχηματίσουν στη συνέχεια πολυμερή που συνδέονται τόσο στα άκρα των υπομονάδων όσο και στην άρθρωσή τους. Μια τέτοια δομή θα μπορούσε να συγκρατεί δύο μόρια DNA περιβάλλοντάς τα.



Εικόνα 23.35 Οι κοντενσίνες εντοπίζονται σε ολόκληρο το μήκος ενός μιτωτικού χρωμοσώματος. Το DNA είναι χρωματισμένο κόκκινο ενώ οι κοντενσίνες κίτρινες. Η φωτογραφία είναι ευγενική προσφορά της Ana Losada και του Tatsuya Hirano.

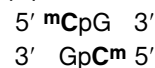
23.19 Η μεθυλίωση του DNA διαιωνίζεται μέσω μιας μεθυλάσης διατήρησης

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η πλειοψηφία των μεθυλομάδων στο DNA εντοπίζονται στις κυτοσίνες του δινουκλεοτιδίου CpG και στις δύο αλυσίδες.
- ▶ Η αντιγραφή μετατρέπει μια πλήρως μεθυλιωμένη θέση σε ημιμεθυλιωμένη.
- ▶ Οι ημιμεθυλιωμένες θέσεις μετατρέπονται σε πλήρως μεθυλιωμένες από μια μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης.

Το DNA μεθυλιώνεται σε συγκεκριμένες, ειδικές θέσεις. Στα βακτήρια, το πρότυπο μεθυλίωσης έχει σχέση με τον καθορισμό του βακτηριακού στελέχους, καθώς και με τη διάκριση του DNA που έχει ή δεν έχει αντιγραφεί (βλ. 15.24: *Ελέγχοντας την κατεύθυνση της επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων*). Στους ευκαρυώτες, ο κυριότερος γνωστός ρόλος της μεθυλίωσης σχετίζεται με τον έλεγχο της μεταγραφής, μια και προκαλεί απενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (βλ. 21.18: *Η γονιδιακή έκφραση συνδέεται με την απομεθυλίωση*).

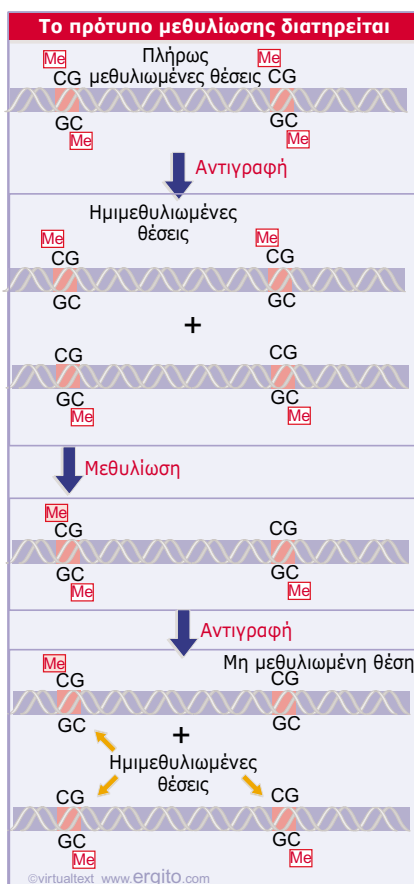
Ένα ποσοστό 2-7% των καταλοίπων κυτοσίνης στο DNA ενός ζωικού κύτταρου είναι μεθυλιωμένο (ο αριθμός ποικίλλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού). Οι περισσότερες μεθυλομάδες εντοπίζονται σε δινουκλεοτίδια CG. Μάλιστα, οι περισσότερες αλληλουχίες CG είναι μεθυλιωμένες. Συνήθως, τα κατάλοιπα C αυτών των σύντομων παλινδρομικών αλληλουχιών είναι μεθυλιωμένα και στις δύο αλυσίδες, δημιουργώντας τη δομή:



Μια τέτοια θέση ονομάζεται **πλήρως μεθυλιωμένη** (fully methylated). Ας αναλογιστούμε, όμως, τις συνέπειες που έχει η αντιγραφή αυτής της θέσης. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 23.36**, κάθε θυγατρικό δίκλωνο μόριο αποτελείται από μία μεθυλιωμένη και μία μη μεθυλιωμένη αλυσίδα. Μια τέτοια θέση ονομάζεται **ημιμεθυλιωμένη** (hemi-methylated).

Η διαιώνιση της μεθυλιωμένης θέσης εξαρτάται από το τι θα συμβεί στο ημιμεθυλιωμένο DNA. Εάν μεθυλιωθεί η μη μεθυλιωμένη αλυσίδα, η θέση θα ξαναγίνει πλήρως μεθυλιωμένη. Ωστόσο, εάν προηγηθεί αντιγραφή, η ημιμεθυλιωμένη κατάσταση θα διαιωνιστεί σε ένα μόνο από τα δίκλωνα μόρια DNA που θα προκύψουν, ενώ το άλλο δίκλωνο μόριο θα είναι μη μεθυλιωμένο. Στην **Εικόνα 23.37** φαίνεται ότι η μεθυλίωση του DNA ελέγχεται από **μεθυλάσες** (methylases) ή **μεθυλοτρανσφεράσες** (methyltransferases), οι οποίες προσθέτουν μεθυλομάδες στη θέση 5 της κυτοσίνης, καθώς και από **απομεθυλάσες** (demethylases), οι οποίες αφαιρούν μεθυλομάδες.

Υπάρχουν δύο τύποι μεθυλοτρανσφερασών του DNA, οι δράσεις των οποίων εξαρτώνται από την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA. Για την τροποποίηση μιας νέας θέσης του DNA απαιτείται η δράση της **de novo μεθυλοτρανσφεράσης** (de novo methyltransferase), η οποία αναγνωρίζει μια ειδική αλληλουχία DNA. Επιδρά **μόνο** σε μη μεθυλιωμένο DNA και προσθέτει μία μεθυλομάδα στη μία από τις δύο



Εικόνα 23.36 Το πρότυπο της μεθυλίωσης μπορεί να διαιωνιστεί από ένα ένζυμο που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα μόνο τις ημιμεθυλιωμένες θέσεις.

αλυσίδες του δικλώνου. Στον ποντικό υπάρχουν δύο *de novo* μεθυλοτρανσφεράσες (οι Dnmt3A και Dnmt3B), οι οποίες αναγνωρίζουν διαφορετικές θέσεις-στόχους και είναι και οι δύο απαραίτητες για την ανάπτυξη.

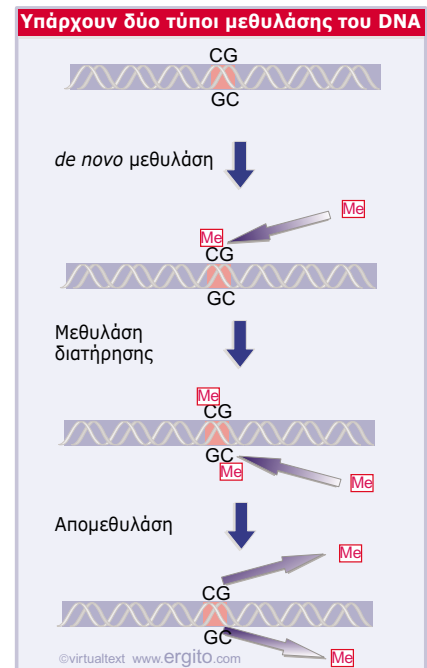
Οι **μεθυλοτρανσφεράσες διατήρησης** (maintenance methyltransferases) δρουν ιδιοστατικά *μόνο σε ημιμεθυλιωμένες θέσεις*, τις οποίες μετατρέπουν σε πλήρως μεθυλιωμένες. Η παρουσία τους εξασφαλίζει ότι το πρότυπο μεθυλίωσης διαιώνίζεται μετά την αντιγραφή. Υπάρχει μόνο μία μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης (Dnmt1) στον ποντικό και είναι απαραίτητη, δεδομένου ότι τα έμβρυα στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της δεν επιβιώνουν πέρα από τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης.

Η μεθυλίωση διατήρησης είναι κυριολεκτικά 100% αποτελεσματική, διασφαλίζοντας ότι *in vivo* επικρατεί συνήθως το πρότυπο που παρουσιάζεται για τη μεθυλίωση της πρώτης θέσης CG στην Εικόνα 23.36. Το αποτέλεσμα είναι ότι, εάν συμβεί μια *de novo* μεθυλίωση στο ένα αλληλόμορφο ενός γενετικού τόπου αλλά όχι στο άλλο, αυτή η διαφορά θα διαιωνιστεί κατά τις επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις, διατηρώντας τη διαφορετικότητα των δύο αλληλομόρφων ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους.

Η μεθυλίωση έχει ποικίλους τύπους στόχων. Οι πιο συνηθισμένοι στόχοι είναι οι υποκινητές γονιδίων. Οι υποκινητές είναι μεθυλιωμένοι όταν το γονίδιο είναι ανενεργό αλλά μη μεθυλιωμένοι όταν είναι ενεργό. Στον ποντικό, η απουσία της πρωτεΐνης Dnmt1 προκαλεί εκτεταμένη απομεθυλίωση στους υποκινητές και λογικά είναι θανατηφόρα εξαιτίας του ότι προκαλεί ανεξέλεγκτη γονιδιακή έκφραση. Το δορυφορικό DNA είναι ένας άλλος στόχος μεθυλίωσης. Οι μεταλλάξεις του *Dnmt3B* στον ποντικό εμποδίζουν τη μεθυλίωση του δορυφορικού DNA, γεγονός που προκαλεί αστάθεια των κεντρομερών σε κυτταρικό επίπεδο. Οι μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο του ανθρώπου προκαλούν ασθένεια. Η σπουδαιότητα της μεθυλίωσης τονίζεται από άλλη μια ανθρώπινη ασθένεια, η οποία προκαλείται από τη μετάλλαξη του γονιδίου της πρωτεΐνης MeCP2, που προσδένεται σε μεθυλιωμένες αλληλουχίες CpG.

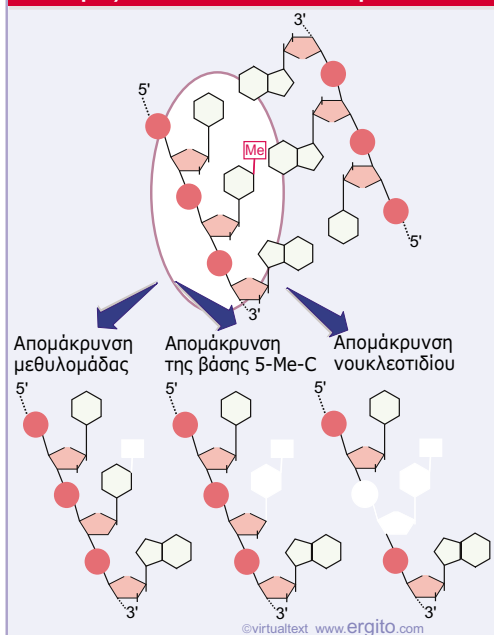
Οι μεθυλοτρανσφεράσες είναι συμβατικά ένζυμα που επιδρούν σε κάποιο στόχο στο DNA. Ωστόσο, μάλλον υπάρχει και ένα σύστημα μεθυλίωσης το οποίο χρησιμοποιεί μια σύντομη αλληλουχία RNA, προκειμένου να στοχεύσει μια αντίστοιχη αλληλουχία DNA και να τη μεθυλιώσει (βλ. 11.18: *Το αντισημαίνον RNA είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης*). Ο μηχανισμός της λειτουργίας αυτού του συστήματος είναι εντελώς άγνωστος μέχρι στιγμής.

Με ποιον τρόπο καθιερώνονται και διαιωνίζονται οι απομεθυλιωμένες περιοχές; Εάν μια θέση DNA δεν είναι μεθυλιωμένη, τότε μια πρωτεΐνη που αναγνωρίζει τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία θα μπορούσε να την προστατεύσει από τη μεθυλίωση. Από τη στιγμή που μεθυλιώνεται μια θέση, υπάρχουν δύο δυνατοί τρόποι για να ξαναμετατραπεί σε μη μεθυλιωμένη. Ο ένας τρόπος είναι να παρεμποδιστεί η δράση της μεθυλοτρανσφεράσης διατήρησης στη συγκεκριμένη θέση, μετά την αντιγραφή της. Ύστερα από ένα δεύτερο κύκλο αντιγραφής, το ένα από τα θυγατρικά δίκλωνα θα είναι απομεθυλιωμένο (όπως φαίνεται για τη δεύτερη θέση CG στην Εικόνα 23.36). Ο δεύτερος τρό-



Εικόνα 23.37 Το πρότυπο μεθυλίωσης ελέγχεται από τρεις τύπους ενζύμων, από τους οποίους έχουν χαρακτηριστεί η *de novo* μεθυλοτρανσφεράση και η μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης, ενώ οι απομεθυλάσες δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη.

Για την απομεθυλίωση του DNA χρησιμοποιούνται τρεις εναλλακτικοί τύποι αντιδράσεων



Εικόνα 23.38 Το DNA μπορεί να απομεθυλωθεί αφαιρώντας τη μεθυλομάδα, τη μεθυλιωμένη βάση ή ολόκληρο το μεθυλιωμένο νουκλεοτίδιο. Η αφαίρεση της βάσης ή του νουκλεοτιδίου απαιτεί την αντικατάστασή τους από ένα σύστημα επιδιόρθωσης.

πος είναι η ενεργητική απομεθυλίωση της θέσης, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.38**, είτε με άμεση αφαίρεση της μεθυλομάδας από την κυτοσίνη είτε με αποκοπή της μεθυλιωμένης κυτοσίνης ή κυτιδίνης από το DNA και επακόλουθη αντικατάστασή της από ένα σύστημα επιδιόρθωσης. Γνωρίζουμε ότι ενεργητική απομεθυλίωση συμβαίνει στο πατρικό γονιδίωμα σύντομα μετά τη γονιμοποίηση, αλλά δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται.

23.20 Η μεθυλίωση του DNA ευθύνεται για το εντύπωμα

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Τα πατρικά και μητρικά αλληλόμορφα μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης κατά τη γονιμοποίηση.
- ▶ Η μεθυλίωση συνήθως σχετίζεται με απενεργοποίηση ενός γονιδίου.
- ▶ Στην περίπτωση γονιδίων με διαφορεικό εντύπωμα, η επιβίωση του εμβρύου μπορεί να εξαρτάται από το αν το λειτουργικό αλληλόμορφο προέρχεται από το γονέα στον οποίο δεν είναι μεθυλιωμένο.
- ▶ Η επιβίωση των ετεροζυγωτών για τα εντυπωμένα γονίδια εξαρτάται από την κατεύθυνση της διασταύρωσης.
- ▶ Τα εντυπωμένα γονίδια οργανώνονται σε συμπλέγματα και μπορεί να εξαρτώνται από ένα στοιχείο τοπικής ρύθμισης όπου συμβαίνει *de novo* μεθυλίωση, εκτός αν αυτή αποτραπεί με κάποιον ειδικό μηχανισμό.

Το πρότυπο μεθυλίωσης των γαμετικών κυττάρων (germ cells) καθιερώνεται σε κάθε φύλο κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης με μια διαδικασία δύο σταδίων: πρώτα διαγράφεται το προϋπάρχον πρότυπο από ολόκληρο το γονιδίωμα με απομεθυλίωση και στη συνέχεια εντυπώνεται το ειδικό πρότυπο για κάθε φύλο.

Όλες οι διαφορές στο πρότυπο μεθυλίωσης των αλληλομόρφων χάνονται κατά τη διαφοροποίηση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων (primordial germ cells) μέσα στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Ανεξάρτητα από το φύλο, το προϋπάρχον πρότυπο μεθυλίωσης διαγράφεται, με αποτέλεσμα ένα τυπικό γονίδιο να είναι απομεθυλιωμένο. Στα αρσενικά, το πρότυπο μεθυλίωσης καθιερώνεται ξανά σε δύο στάδια. Το χαρακτηριστικό πρότυπο μεθυλίωσης ενός ώριμου σπερματοζωαρίου (mature sperm) εντυπώνεται κατά το στάδιο του σπερματοκυττάρου (spermatocyte). Ωστόσο, μετά τη γονιμοποίηση γίνονται επιπλέον αλλαγές. Στα θηλυκά, το μητρικό πρότυπο εντυπώνεται κατά την ωογένεση, καθώς τα ωοκύτταρα (oocytes) ωριμάζουν—μέσω μείωσης—μετά τη γέννηση του ατόμου.

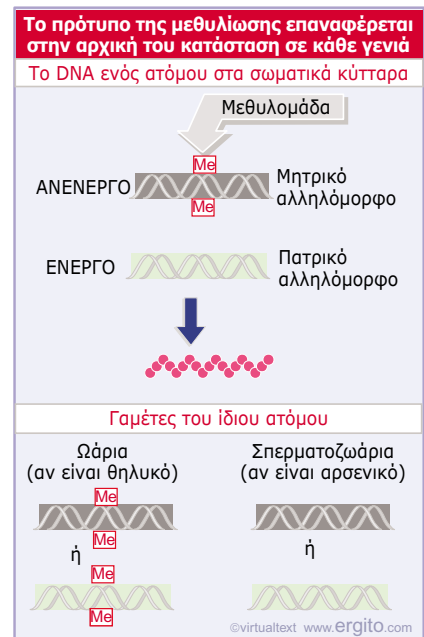
Όπως θα ήταν αναμενόμενο, στους γαμέτες τα γονίδια είναι μεθυλιωμένα και άρα ανενεργά. Εντούτοις, υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα δύο φύλα εμφανίζουν διαφορές, έτσι ώστε ένας γενετικός τύπος να είναι μεθυλιωμένος στο ένα και όχι στο άλλο είδος γαμετών. Ένα σημαντικό ερώτημα είναι πώς καθορίζεται η ειδικότητα του προτύπου μεθυλίωσης στους αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες.

Νωρίς κατά την εμβρυογένεση γίνονται αλλαγές συστηματικά. Ορισμένες θέσεις παραμένουν μεθυλιωμένες, ενώ άλλες απομεθυλιώνονται στα κύτταρα εκείνα που εκφράζουν το αντίστοιχο γονίδιο. Από το πρότυπο των αλλαγών μπορούμε να συμπεράνουμε ότι κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού απομεθυλιώνονται ειδικές αλληλουχίες, καθώς ενεργοποιούνται γονίδια σε αντίστοιχες περιοχές του γονιδιώματος.

Το ειδικό πρότυπο μεθυλίωσης των αναπαραγωγικών κυττάρων ευθύνεται για το φαινόμενο του γενετικού εντυπώματος (imprinting), το οποίο περιγράφει τη διαφορετική συμπεριφορά των αλληλομόρφων που κληρονομούνται από κάθε γονέα. Η έκφραση ορισμένων γονιδίων στα έμβρυα του ποντικού εξαρτάται από το φύλο του γονέα από τον οποίο κληρονομήθηκαν. Για παράδειγμα, το αλληλόμορφο για τον IGF-II (Insulin-like Growth Factor II, αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης II) που κληρονομείται από τον πατέρα είναι σε θέση να εκφράζεται, ενώ το αντίστοιχο αλληλόμορφο που κληρονομείται από τη μητέρα δεν εκφράζεται. Το γονίδιο του IGF-II είναι μεθυλιωμένο στα ωκύτταρα, ενώ είναι μη μεθυλιωμένο στα σπερματοκύτταρα, με αποτέλεσμα τα δύο αλληλόμορφα να συμπεριφέρονται διαφορετικά στο ζυγωτό (zygote). Αυτό είναι το πιο συνηθισμένο πρότυπο, αν και η εξάρτηση από το φύλο είναι αντίστροφη για ορισμένα γονίδια. Έτσι, το αντίθετο ακριβώς πρότυπο (δηλαδή έκφραση του μητρικού αλληλομόρφου αλλά όχι του πατρικού) παρατηρείται στην περίπτωση του IGF-IIR, δηλαδή του υποδοχέα του IGF-II.

Αυτός ο φυλοειδικός τρόπος κληρονόμησης απαιτεί καθιέρωση του προτύπου μεθυλίωσης ειδικά κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Η μοίρα ενός υποθετικού γενετικού τόπου ενός ποντικού παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.39**. Νωρίς στην ανάπτυξη του εμβρύου, το πατρικό αλληλόμορφο είναι μη μεθυλιωμένο και εκφράζεται, ενώ το μητρικό αλληλόμορφο είναι μεθυλιωμένο και σιωπηλό. Τι συμβαίνει, όμως, όταν ο ίδιος ο ποντικός σχηματίζει τους δικούς του γαμέτες; Εάν πρόκειται για αρσενικό ποντικό, το αλληλόμορφο που θα ενσωματωθεί στο σπερματοζωάριο θα πρέπει να είναι μη μεθυλιωμένο, ανεξάρτητα από το αν αρχικά ήταν μεθυλιωμένο ή όχι. Επομένως, όταν ένα μητρικό αλληλόμορφο βρεθεί μέσα σε ένα σπερματοκύτταρο, θα πρέπει να υποστεί απομεθυλίωση. Εάν ο ποντικός είναι θηλυκός, το αλληλόμορφο που θα ενσωματωθεί στο ωκύτταρο θα πρέπει να είναι μεθυλιωμένο. Επομένως, εάν πρόκειται για το πατρικό αλληλόμορφο, θα πρέπει να υποστεί μεθυλίωση.

Ως συνέπεια του γενετικού εντυπώματος, το έμβρυο χρειάζεται οπωσδήποτε ένα πατρικό αλληλόμορφο για το συγκεκριμένο γονίδιο. Έτσι, στην περίπτωση κληρονόμησης μιας υπολειπόμενης θανατηφόρας μετάλλαξης, τα ετερόζυγα έμβρυα θα επιβιώσουν εάν το αλληλόμορφο του άγριου τύπου προέρχεται από τον πατέρα, αλλά θα πεθάνουν εάν το αλληλόμορφο του άγριου τύπου προέρχεται από τη μητέρα. Αυτού του τύπου η εξάρτηση από την κατεύθυνση της διασταύρωσης (σε αντίθεση με τη μεντελική –δηλαδή γενετική– κληρονομικότητα) είναι ένα παράδειγμα επιγενετικής κληρονομικότητας, όπου κάποιος παράγοντας, ανεξάρτητος από την αλληλουχία του γονιδίου, καθορίζει το φαινότυπο (βλ. 23.22: *Ορισμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά κληρονομούνται*). Μολονότι τα πατρικά και μητρικά αλληλόμορφα έχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες, εκφράζονται με



Εικόνα 23.39 Το τυπικό πρότυπο εντυπώματος προβλέπει ότι ένα μεθυλιωμένο αλληλόμορφο είναι ανενεργό. Εάν το αλληλόμορφο αυτό είναι μητρικής προέλευσης, τότε παραμένει ενεργό μόνο το πατρικό αλληλόμορφο, το οποίο καθίσταται, έτσι, απαραίτητο για την επιβίωση. Κατά το σχηματισμό των γαμετών, το πρότυπο μεθυλίωσης επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση, έτσι ώστε όλα τα σπερματοκύτταρα να φέρουν τον πατρικό τύπο και όλα τα ωκύτταρα το μητρικό.

διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με το γονέα που τα παρείχε. Αυτές οι διαφορές κληρονομούνται διαμέσου της μείωσης και των επακόλουθων σωματικών μιτώσεων.

Τα εντυπωμένα γονίδια μερικές φορές σχηματίζουν συμπλέγματα (clusters). Από τα 17 γνωστά εντυπωμένα γονίδια του ποντικού, περισσότερα από τα μισά εντοπίζονται σε δύο συγκεκριμένες περιοχές, οι οποίες περιλαμβάνουν τόσο μητρικά όσο και πατρικά εκφραζόμενα γονίδια. Αυτό υποδηλώνει την πιθανότητα οι μηχανισμοί εντυπώματος να λειτουργούν σε μεγάλες αποστάσεις. Ορισμένες ενδείξεις προς αυτή την κατεύθυνση προέρχονται από χρωμοσωμικά ελλείμματα σε πληθυσμούς ανθρώπων, τα οποία προκαλούν τα σύνδρομα Prader-Willi και Angelman. Στα περισσότερα από αυτά τα περιστατικά παρατηρείται έλλειμμα της ίδιας περιοχής του γονιδιώματος, μεγέθους 4 Mb, αλλά τα σύνδρομα είναι διαφορετικά, ανάλογα με το από ποιο γονέα κληρονομήθηκε το έλλειμμα. Ο λόγος είναι ότι η περιοχή του ελλείμματος φέρει τουλάχιστον ένα γονίδιο που εντυπώνεται πατρικά και τουλάχιστον ένα που εντυπώνεται μητρικά. Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολύ μικρότερων ελλειμμάτων. Έτσι, το σύνδρομο Prader-Willi μπορεί να προκληθεί από ένα έλλειμμα 20 kb το οποίο απενεργοποιεί μακρινά γονίδια που βρίσκονται πέρα από τα δύο άκρα του εντυπωμένου γονιδίου. Η κυριότερη συνέπεια του ελλείμματος είναι ότι δεν επιτρέπει σε έναν πατέρα να επαναφέρει το πατρικό πρότυπο σε ένα χρωμόσωμα που είχε κληρονομηθεί από τη μητέρα του. Το αποτέλεσμα είναι ότι αυτά τα γονίδια παραμένουν με το μητρικό πρότυπο, οπότε τόσο τα πατρικά όσο και τα μητρικά αλληλόμορφα είναι ανενεργά στους απογόνους. Ακριβώς το αντίστροφο αποτέλεσμα παρατηρείται στην περίπτωση ορισμένων μικρών ελλειμμάτων που προκαλούν το σύνδρομο Angelman. Η αιτία των σπάνιων αυτών περιπτώσεων είναι ότι η περιοχή του ελλείμματος συνιστά κάποιο είδος «κέντρου εντυπώματος», το οποίο επιδρά σε γενετικούς τόπους που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση και τους μετατρέπει από τον ένα γονικό τύπο στον άλλο.

23.21 Γονίδια με αντίθετο εντύπωμα μπορεί να ελέγχονται από το ίδιο κέντρο

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η ρύθμιση των εντυπωμένων γονιδίων εξαρτάται από τη μεθυλίωση *cis*-δραστικών θέσεων.
- ▶ Η μεθυλίωση μπορεί να ευθύνεται είτε για την ενεργοποίηση είτε για την απενεργοποίηση ενός γονιδίου.

Το εντύπωμα καθορίζεται από τη μεθυλίωση μιας *cis*-δραστικής θέσης κοντά σε ένα ή περισσότερα γονίδια-στόχους. Αυτές οι ρυθμιστικές θέσεις είναι γνωστές ως επικράτειες διαφορικής μεθυλίωσης (DMDs, **D**ifferentially **M**ethylated **D**omains) ή περιοχές ελέγχου του εντυπώματος (ICR, **I**mprinting **C**ontrol **R**egions). Ελλείμματα σε αυτές τις θέσεις αίρουν το εντύπωμα, με αποτέλεσμα οι γενετικοί

τόποι-στόχοι να συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο είτε προέρχονται από το μητρικό είτε από το πατρικό γονιδίωμα.

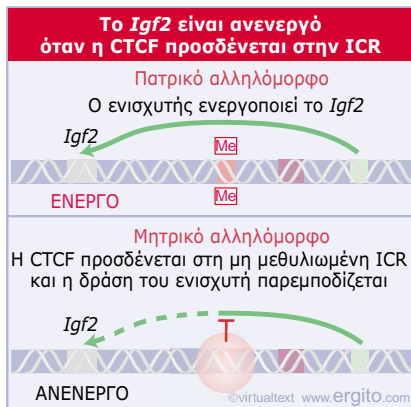
Η συμπεριφορά μιας περιοχής του γονιδιώματος που περιλαμβάνει δύο γονίδια, τα *Igf2* και *H19*, αποτελεί τυπικό παράδειγμα των διαφορετικών τρόπων με τους οποίους η μεθυλίωση μπορεί να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. Στην **Εικόνα 23.40** φαίνεται ότι τα δύο γονίδια αποκρίνονται με αντίθετο τρόπο στη μεθυλίωση μιας περιοχής ICR που βρίσκεται ανάμεσά τους. Η ICR είναι μεθυλιωμένη στο πατρικό αλληλόμορφο, όπου το *H19* εμφανίζεται απενεργοποιημένο. Ωστόσο, στο ίδιο αλληλόμορφο, το *Igf2* εκφράζεται. Η αντίστροφη κατάσταση παρατηρείται σε ένα μητρικό αλληλόμορφο, όπου η ICR δεν είναι μεθυλιωμένη. Εδώ, το *H19* εκφράζεται, ενώ το *Igf2* είναι απενεργοποιημένο.

Ο έλεγχος του *Igf2* διενεργείται από ένα μονωτή της ICR. Στην **Εικόνα 23.41** φαίνεται ότι, όταν η ICR δεν είναι μεθυλιωμένη, προσδένεται σ' αυτήν η πρωτεΐνη CTCF δημιουργώντας ένα μονωτή που παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του υποκινητή του *Igf2* από έναν εξειδικευμένο ενισχυτή. Πρόκειται για ένα ασυνήθιστο φαινόμενο, κατά το οποίο η μεθυλίωση ενεργοποιεί έμμεσα ένα γονίδιο παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του μονωτή.

Η ρύθμιση του *H19* εμφανίζει τον πιο συνηθισμένο μηχανισμό ελέγχου, κατά τον οποίο η μεθυλίωση δημιουργεί την ανενεργή εντυπωμένη κατάσταση. Αυτό πιθανότατα αντανάκλα την άμεση επίδραση που έχει η μεθυλίωση στη λειτουργία του υποκινητή.



Εικόνα 23.40 Η περιοχή ICR είναι μεθυλιωμένη στο πατρικό αλληλόμορφο, όπου το *Igf2* είναι ενεργό και το *H19* ανενεργό. Η ICR είναι μη μεθυλιωμένη στο μητρικό αλληλόμορφο, όπου το *Igf2* είναι ενεργό και το *H19* ανενεργό.



Εικόνα 23.41 Η μη μεθυλιωμένη περιοχή ICR προσδένει την πρωτεΐνη CTCF και δρα ως μονωτής που παρεμποδίζει έναν παρακείμενο ενισχυτή να ενεργοποιήσει το *Igf2*.

23.22 Ορισμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά κληρονομούνται

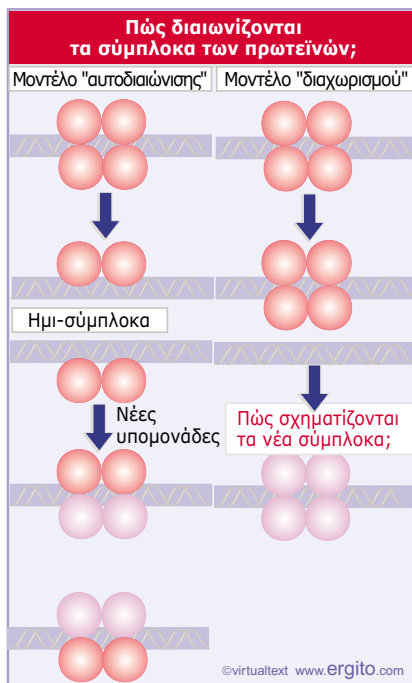
Σημαντικές έννοιες

- ▶ Τα επιγενετικά φαινόμενα μπορεί να προκύψουν από την τροποποίηση ενός νουκλεϊκού οξέος μετά τη σύνθεσή του ή από τη διαίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών δομών.

Η επιγενετική κληρονομικότητα (epigenetic inheritance) αναφέρεται στην κληρονόμηση διακριτών φαινοτύπων, οι οποίοι δεν προκύπτουν από αλλαγές στο γενετικό υλικό των ατόμων που τις εμφανίζουν. Πώς άραγε μπορεί να συμβαίνει αυτό;

Μπορούμε να κατατάξουμε τους επιγενετικούς μηχανισμούς σε δύο γενικές κατηγορίες:

- ▶ Μπορεί μια χημική ομάδα να συνδεθεί ομοιοπολικά στο DNA προκαλώντας μια τροποποίηση, η οποία στη συνέχεια μπορεί να διαίωνίζεται. Έτσι, δύο αλληλόμορφα με την ίδια αλληλουχία μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης, που τους προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες.
- ▶ Εναλλακτικά, μια πρωτεΐνη μπορεί να παγιωθεί σε μια αυτοδιαωριζόμενη κατάσταση. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη συναρμολόγηση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, την τροποποίηση μίας ή περισσότερων ειδικών πρωτεϊνών ή την καθιέρωση μιας διαφοροποιημένης πρωτεϊνικής στερεοδιαμόρφωσης.



Εικόνα 23.42 Δε γνωρίζουμε τι ακριβώς συμβαίνει στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

Η μεθυλίωση μπορεί να καθιερώσει ένα πρότυπο επιγενετικής κληρονομικότητας με την προϋπόθεση ότι η μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης δρα συνεχώς, αποκαθιστώντας τη μεθυλίωση μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής (βλ. Εικόνα 23.36). Το πρότυπο μεθυλίωσης μπορεί να διαιωνίζεται για άπειρο αριθμό σωματικών μιτώσεων. Αυτό πιθανότατα αποτελεί την τυπική περίπτωση. Ωστόσο, το πρότυπο της μεθυλίωσης μπορεί επίσης να διαιωνίζεται και μέσω της μείωσης: για παράδειγμα, στο μύκητα *Ascobolus* παρατηρούνται επιγενετικά φαινόμενα που διαδίδονται μέσω της μίτωσης και της μείωσης, διατηρώντας το πρότυπο της μεθυλίωσης. Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα επιγενετικά φαινόμενα προκύπτουν από το διαφορετικό τρόπο επαναφοράς του αρχικού προτύπου μεθυλίωσης κατά τη μείωση γαμετοκυττάρων αρσενικών ή θηλυκών ατόμων.

Οι περιπτώσεις στις οποίες η διατήρηση των επιγενετικών επιδράσεων φαίνεται να ενέχει μεταβολές της πρωτεϊνικής φύσης είναι λιγότερο κατανοητές σε μοριακό επίπεδο. Το φαινόμενο της ποικιλότητας λόγω θέσης οφείλεται στην εξάπλωση της ιδιοστατικής ετεροχρωματίνης σε μεταβλητή απόσταση και στη διαιώνιση της δομής της, στη συνέχεια, μέσω των σωματικών διαιρέσεων. Δεδομένου ότι στο *Saccharomyces* δεν παρατηρείται μεθυλίωση του DNA και στην *Drosophila* αυτή είναι εξαιρετικά περιορισμένη, η επιγενετική κληρονομικότητα της ποικιλότητας λόγω θέσης ή της τελομερικής αποσιώπησης σε αυτούς τους οργανισμούς πιθανότατα οφείλεται στη διαιώνιση ειδικών πρωτεϊνικών δομών.

Στην **Εικόνα 23.42** περιγράφονται δύο ακραία ενδεχόμενα για τη μοίρα ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου κατά την αντιγραφή:

- ▶ Ένα σύμπλοκο θα ήταν σε θέση να διαιωνίζει τον εαυτό του αν μπορούσε να διαιρείται συμμετρικά, έτσι ώστε κάθε ημι-σύμπλοκο να συνδέεται με ένα θυγατρικό δίκλωνο μόριο DNA. Εάν τα ημι-σύμπλοκα αποτελούν παράλληλα και κέντρα πολυμερισμού για το σχηματισμό ολοκληρωμένων συμπλόκων, τότε είναι δυνατή η επαναφορά της αρχικής κατάστασης. Αυτός ο μηχανισμός είναι ουσιαστικά ανάλογος με τη διατήρηση του προτύπου της μεθυλίωσης. Το πρόβλημα με αυτό το μοντέλο είναι ότι δεν υπάρχει κανένας εμφανής λόγος που να δικαιολογεί μια τέτοια συμπεριφορά των πρωτεϊνών.
- ▶ Ένα σύμπλοκο θα μπορούσε να διατηρείται ως μία ενιαία μονάδα που παραμένει προσδεδεμένη σε ένα από τα δύο θυγατρικά δίκλωνα μόρια DNA. Το πρόβλημα με αυτό το μοντέλο είναι ότι προβλέπει τη συναρμολόγηση *de novo* ενός καινούριου συμπλόκου στο δεύτερο θυγατρικό δίκλωνο και δεν είναι εμφανές πώς μπορεί να συμβαίνει κάτι τέτοιο.

Ας αναλογιστούμε τώρα την ανάγκη διαιώνισης της ετεροχρωματίνης δομής, η οποία δημιουργείται από διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Ας υποθέσουμε ότι μια πρωτεΐνη κατανέμεται με σχεδόν συνεχή τρόπο κατά μήκος μιας περιοχής ετεροχρωματίνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23.20. Εάν οι υπομονάδες κατανέμονται τυχαία στα δύο θυγατρικά μόρια DNA κατά την αντιγραφή, τα δύο δίκλωνα θα εξακολουθούν να είναι επισημασμένα με την πρωτεΐνη, μολονότι η ένταση της σήμανσης θα έχει υποδιπλασιαστεί σε σχέση με την έντασή της πριν την αντιγραφή. Εάν η πρωτεΐνη έχει την ιδιότητα να προκαλεί την πρόσδεση νέων υπομονάδων, τότε η αρχική κατάσταση μπο-

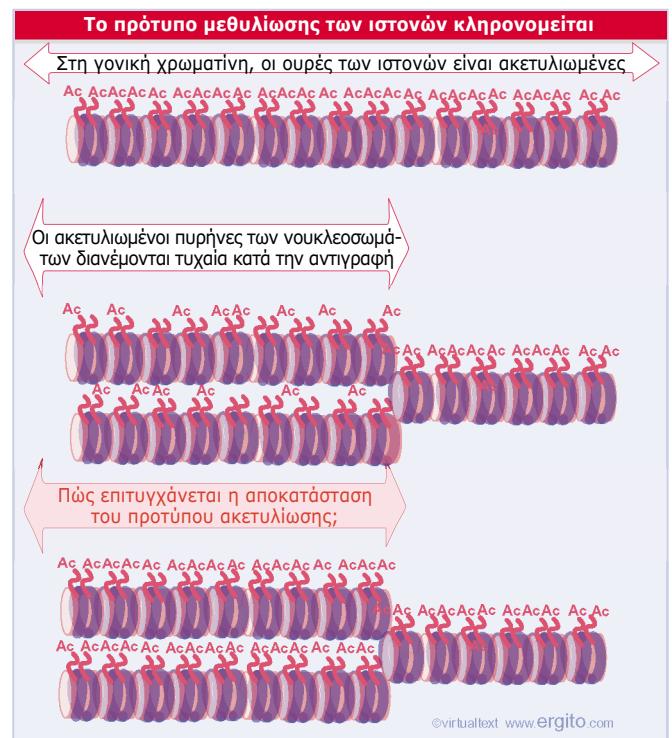
ρεί να καθιερωθεί ξανά. Βασικά, η ύπαρξη των επιγενετικών φαινομένων μάς αναγκάζει να υποθέσουμε ότι η υπεύθυνη πρωτεΐνη θα πρέπει να έχει ικανότητα αυτο-συναρμολόγησης (*self-assembling capacity*) ή να μπορεί να λειτουργεί η ίδια ως «μήτρα» για το σχηματισμό νέων όμοιων δομών (*self-templating capacity*).

Σε ορισμένα επιγενετικά φαινόμενα μπορεί να παίζει σημαντικότερο ρόλο κάποια συγκεκριμένη τροποποίηση της πρωτεΐνης παρά η ίδια η παρουσία της. Η ενεργότητα της χρωματίνης συσχετίζεται με το βαθμό ακετυλίωσης των N-τελικών ουρών των ιστονών H3 και H4. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής συνδέεται με την ακετυλίωση στην περιοχή των υποκινητών ενώ η καταστολή της με την απακετυλίωση (βλ. 23.7: *Οι ακετυλάσες συνδέονται με ενεργοποιητές*). Η πιο δραματική συσχέτιση παρατηρείται στο απενεργοποιημένο χρωμόσωμα X, στα κύτταρα των θηλυκών θηλαστικών, το οποίο φέρει υπο-ακετυλιωμένες ιστόνες H4.

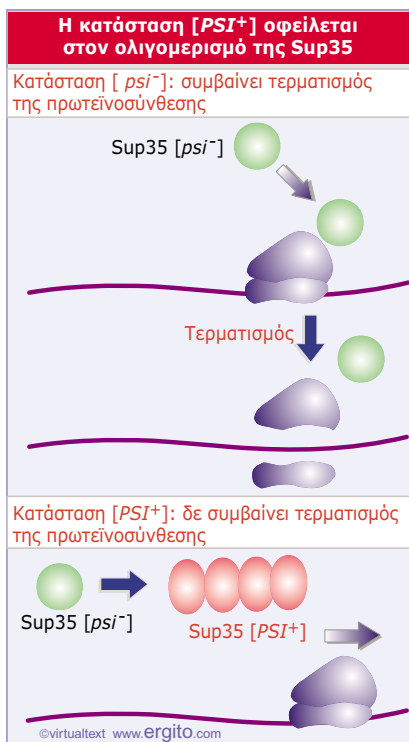
Η αδράνεια της ιδιοστατικής ετεροχρωματίνης ίσως οφείλεται στο ότι οι ιστόνες δεν είναι ακετυλιωμένες. Πράγματι, εάν προσκολληθεί με τεχνητό τρόπο μια ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών στην περιοχή της τελομερικής ετεροχρωματίνης στη ζύμη, τα αποσιωπημένα γονίδια ενεργοποιούνται. Όταν η ζύμη εκτίθεται στον καταστολέα της απακετυλίωσης τριχοστατίνη A (TSA, **Trichostatin A**), η κεντρομερική ετεροχρωματίνη ακετυλιώνεται και τα αποσιωπημένα γονίδια στις κεντρομερικές περιοχές ενεργοποιούνται. Η επίδραση της TSA μπορεί να παραμείνει ακόμη και μετά την απομάκρυνσή της. Μάλιστα, μπορεί να διαιωνιστεί μέσω της μίτωσης και της μείωσης. Αυτό υποδηλώνει την καθιέρωση ενός επιγενετικού χαρακτηριστικού, μέσω της μεταβολής της ακετυλίωσης των ιστονών.

Με ποιον τρόπο άραγε διαιωνίζεται το πρότυπο της ακετυλίωσης; Ας υποθέσουμε ότι το τετραμερές $H3_2 \cdot H4_2$ κατανέμεται τυχαία στα δύο θυγατρικά δίκλωνα μόρια DNA, δημιουργώντας την κατάσταση που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.43**. Κάθε θυγατρικό μόριο θα περιέχει κάποια οκταμερή ιστονών που είναι πλήρως ακετυλιωμένα στις ουρές των ιστονών H3 και H4, καθώς και κάποια άλλα που στερούνται ακετυλίωσης. Επιχειρώντας να ερμηνεύσουμε το επιγενετικό φαινόμενο, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρουσία μερικών πλήρως ακετυλιωμένων οκταμερών ιστονών παρέχει ένα σήμα που επάγει την ακετυλίωση των μη ακετυλιωμένων οκταμερών.

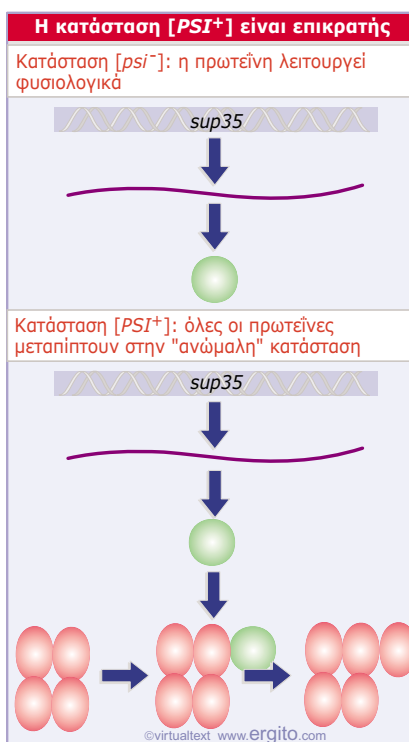
Στην πραγματικότητα, ο μηχανισμός πιθανότατα είναι πιο περίπλοκος απ' ό,τι φαίνεται στην Εικόνα 23.43, επειδή έχει παρατηρηθεί ότι η ακετυλίωση που συμβαίνει κατά την αντιγραφή μπορεί να είναι παροδική. Εάν η ακετυλίωση απλώς αναστρέφεται μετά την ενσωμάτωση των ιστονών σε νουκλεοσώματα, ίσως να μη σχετίζεται με το παρατηρούμενο επιγενετικό φαινόμενο. Μια εναλλακτική πιθανότητα είναι να καταστέλλεται η συνηθισμένη απακετυλίωση –αντί να επάγεται ακετυλίωση– ή, ακόμη, να συμβαίνουν και τα δύο γεγονότα παράλληλα.



Εικόνα 23.43 Οι ακετυλιωμένοι πυρήνες των νουκλεοσωμάτων συνηθίζουν να διανέμονται τυχαία στα ινίδια της θυγατρικής χρωματίνης κατά την αντιγραφή. Κάθε θυγατρικό ινίδιο αποτελείται από ένα μείγμα παλαιών (ακετυλιωμένων) και καινούριων (μη ακετυλιωμένων) νουκλεοσωμικών πυρήνων.



Εικόνα 23.44 Η μορφή της πρωτεΐνης Sup35 καθορίζει τη δυνατότητα τερματισμού της μετάφρασης.



Εικόνα 23.45 Η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη Sup35 μετατρέπεται στη μορφή $[PSI^+]$, εφόσον υπάρχει μέσα στο κύτταρο η ανώμαλη αυτή μορφή της πρωτεΐνης.

23.23 Τα πρωτεόνια της ζύμης εμφανίζουν ασυνήθιστη κληρονομικότητα

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η πρωτεΐνη Sup35 στη διαλυτή μορφή άγριου τύπου λειτουργεί ως παράγοντας τερματισμού της μετάφρασης.
- ▶ Μπορεί επίσης να υφίσταται σε μια εναλλακτική μορφή που σχηματίζει ολιγομερή συσσωματώματα, οπότε παύει να είναι ενεργή κατά την πρωτεϊνοσύνθεση.
- ▶ Η παρουσία της ολιγομερούς μορφής κάνει τις αρτιγενείς πρωτεΐνες Sup35 να αποκτήσουν την ίδια ανενεργή δομή.
- ▶ Η μετατροπή από τη μία μορφή στην άλλη επηρεάζεται από την παρουσία συγκεκριμένων μοριακών συνοδών.
- ▶ Η μορφή άγριου τύπου προκαλεί τον υποτελή φαινότυπο $[psi^-]$ ενώ η μεταλλαγμένη μορφή τον επικρατή φαινότυπο $[PSI^+]$.

Μία από τις πλέον σαφείς περιπτώσεις εξάρτησης της επιγενετικής κληρονομικότητας από την κατάσταση μιας πρωτεΐνης παρατηρείται στα **πρωτεόνια** (prions), τα οποία είναι μολυσματικοί παράγοντες πρωτεϊνικής φύσης. Τα πρωτεόνια έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες υπεύθυνοι για κάποια επιγενετικά φαινόμενα στη ζύμη, καθώς και ως το αίτιο νευρολογικών παθήσεων στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Στη ζύμη παρατηρείται ένα εντυπωσιακό επιγενετικό φαινόμενο, όπου δύο κληρονομήσιμες καταστάσεις ελέγχονται από τον ίδιο γενετικό τόπο, *μολονότι η αλληλουχία του υπεύθυνου γονιδίου είναι η ίδια και στις δύο περιπτώσεις*. Οι δύο αυτές καταστάσεις είναι η $[psi^-]$ και η $[PSI^+]$. Η αλλαγή από τη μία κατάσταση στην άλλη γίνεται αυθόρμητα και με χαμηλή συχνότητα.

Ο χαρακτήρας *psi* χαρτογραφείται στο γενετικό τόπο *sup35*, ο οποίος κωδικοποιεί έναν παράγοντα τερματισμού της μετάφρασης. Στην **Εικόνα 23.44** συνοψίζονται οι λειτουργίες της πρωτεΐνης Sup35 στη ζύμη. Σε κύτταρα με φαινότυπο $[psi^-]$, το γονίδιο είναι ενεργό και η πρωτεΐνη Sup35 τερματίζει την πρωτεϊνοσύνθεση. Αντίθετα, σε κύτταρα με φαινότυπο $[PSI^+]$, ο παράγοντας δε λειτουργεί και δεν επιτυγχάνεται ορθός τερματισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης. Για το λόγο αυτό, η υψηλή αποτελεσματικότητα των καταστολέων των κωδικονίων ochra επιφέρει το θάνατο στα στελέχη $[PSI^+]$.

Τα στελέχη $[PSI^+]$ εμφανίζουν ασυνήθιστες γενετικές ιδιότητες. Όταν ένα στέλεχος $[psi^-]$ διασταυρώνεται με ένα στέλεχος $[PSI^+]$, όλοι οι απόγονοι είναι $[PSI^+]$. Αυτό είναι το πρότυπο κληρονομικότητας που θα αναμενόταν για έναν εξωχρωμοσωμικό παράγοντα, αλλά το κληρονομούμενο χαρακτηριστικό $[PSI^+]$ δεν έχει βρεθεί να κωδικοποιείται από κάποιο εξωχρωμοσωμικό νουκλεϊκό οξύ. Το χαρακτηριστικό $[PSI^+]$ είναι μετασταθές (metastable), δηλαδή, μολονότι κληρονομείται από τους περισσότερους απογόνους, χάνεται με συχνότητα υψηλότερη από αυτήν που αναμένεται με βάση τη συνηθισμένη συχνότητα μεταλλαξιγένεσης. Παρόμοια συμπεριφορά εκδηλώνει επίσης ο γενετικός τόπος *URE2*, ο οποίος κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που απαιτείται για την αζωτο-επαγόμενη καταστολή ορισμένων καταβολι-

κών ενζύμων. Όταν ένα στέλεχος ζύμης μετατρέπεται στην εναλλακτική κατάσταση που ονομάζεται [URE3], η πρωτεΐνη Ure2 παύει να είναι πλέον λειτουργική.

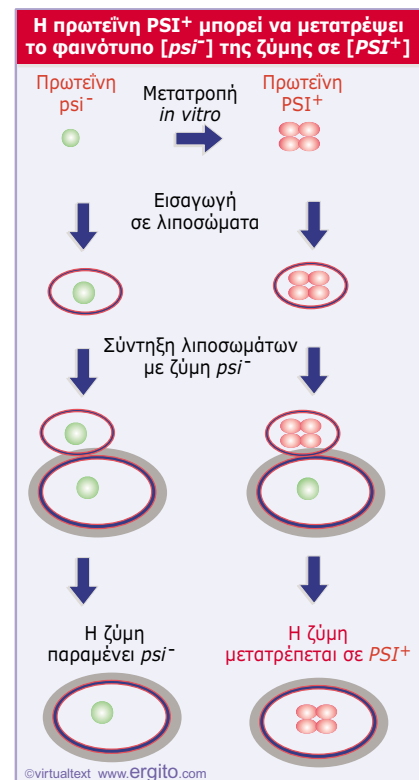
Η κατάσταση [PSI⁺] καθορίζεται από τη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης Sup35. Σε ένα κύτταρο άγριου τύπου [psi⁻], η πρωτεΐνη λειτουργεί φυσιολογικά. Όμως, σε ένα κύτταρο [PSI⁺], η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μια εναλλακτική στερεοδιαμόρφωση χωρίς τη φυσιολογική της λειτουργικότητα. Για να ερμηνεύσουμε την παρατηρούμενη μονόπλευρη επικράτηση του [PSI⁺] έναντι του [psi⁻] κατά τις γενετικές διασταυρώσεις, θα πρέπει να υποθέσουμε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης με τη στερεοδιαμόρφωση [PSI⁺] αναγκάζει όλες τις άλλες πρωτεΐνες στο κύτταρο να υιοθετήσουν την ίδια στερεοδιαμόρφωση. Αυτό προϋποθέτει ότι η πρωτεΐνη [PSI⁺] αλληλεπιδρά με την αρτιγενή πρωτεΐνη, δημιουργώντας μια ολιγομερή μορφή στην οποία η πρωτεΐνη [PSI⁺] λειτουργεί ως κέντρο πολυμερισμού, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23.45**.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεϊνών Sup35 και Ure2 είναι ότι και οι δύο αποτελούνται από δύο επικράτειες που λειτουργούν αυτόνομα. Η ενεργότητα της πρωτεΐνης οφείλεται στην C-τελική επικράτεια. Η N-τελική επικράτεια ενέχεται στο σχηματισμό των δομών που απενεργοποιούν την πρωτεΐνη. Επομένως κύτταρα ζύμης στα οποία η N-τελική επικράτεια της Sup35 έχει απαλειφθεί δεν μπορούν να αποκτήσουν την κατάσταση [PSI⁺]. Επίσης, η παρουσία της N-τελικής επικράτειας [PSI⁺] επαρκεί για να διατηρηθεί η πρωτεΐνη Sup35 στην κατάσταση [PSI⁺]. Το βασικό χαρακτηριστικό της N-τελικής επικράτειας είναι η αφθονία των καταλοίπων γλουταμίνης (Gln) και ασπαραγίνης (Asn).

Η απώλεια λειτουργίας που εκδηλώνεται ως φαινότυπος [PSI⁺] οφείλεται στην απομόνωση της πρωτεΐνης λόγω της δέσμευσής της σε ένα ολιγομερές σύμπλοκο. Η πρωτεΐνη Sup35 στα κύτταρα [PSI⁺] συσσωματώνεται σε διακριτές εστίες, ενώ στα κύτταρα [psi⁻] είναι διάχυτη στο κυτταροδιάλυμα. Η πρωτεΐνη Sup35 από κύτταρα [PSI⁺] δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια (amyloid fibers) *in vitro*, τα οποία περιέχουν χαρακτηριστικά υψηλό ποσοστό δομών β-φύλλων.

Η σημασία της στερεοδιαμόρφωσης της πρωτεΐνης (και όχι της ομοιοπολικής τροποποίησής της) φανερώνεται από τις επιπτώσεις που παρατηρούνται όταν αλλάζουν οι συνθήκες οι οποίες επηρεάζουν τη δομή της. Έτσι, συνθήκες μετουσίωσης οδηγούν σε απώλεια της κατάστασης [PSI⁺]. Από την άλλη, ο μοριακός συνοδός (chaperone) Hsp104 ενέχεται στην κληρονόμηση της [PSI⁺]. Οι επιδράσεις του αποτελούν παράδοξο, μια και τόσο το έλλειμμα όσο και η υπερέκφραση του Hsp104 παρεμποδίζουν τη διατήρηση της κατάστασης [PSI⁺]. Αυτό δείχνει ότι ο Hsp104 απαιτείται για κάποια αλλαγή στη δομή της Sup35, η οποία είναι αναγκαία για την απόκτηση της μορφής [PSI⁺], αλλά αυτή η επίδραση πρέπει να είναι παροδική.

Χρησιμοποιώντας την ικανότητα της Sup35 να υιοθετεί την ανενεργή μορφή της *in vitro*, μπορούμε να αποδείξουμε βιοχημικά το ρόλο αυτής της πρωτεΐνης. Στην **Εικόνα 23.46** παρουσιάζεται ένα εντυπωσιακό πείραμα κατά το οποίο η πρωτεΐνη Sup35 αρχικά μετατράπηκε *in vitro* στην ανενεργή της μορφή, στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα σε λιποσώματα (δηλαδή συσκευάστηκε στο εσωτερικό μιας τεχνητής μεμβράνης) και τελικά εισήχθη σε κύτταρα ζύμης [psi⁻],



Εικόνα 23.46 Καθαρή πρωτεΐνη με μορφή [PSI⁺] μπορεί να μετατρέψει το φαινότυπο της ζύμης από [psi⁻] σε [PSI⁺].

μέσω σύντηξης της λιποσωμικής μεμβράνης με την κυτταροπλασματική. Προς μεγάλη έκπληξη των ερευνητών, τα κύτταρα της ζύμης μετατράπηκαν σε [*PSI*⁺]. Αυτό το πείραμα κατέρριψε όλες τις προηγούμενες αντιρρήσεις πάνω στην άποψη ότι μια πρωτεΐνη μπορεί να προκαλεί επιγενετικά φαινόμενα. Πειράματα τα οποία βασίζονται σε διασταυρώσεις μεταξύ κυττάρων ή σε έκθεση των κυττάρων σε εκχυλίσματα από άλλα κύτταρα ενέχουν πάντοτε τον κίνδυνο μεταφοράς κάποιου νουκλεϊκού οξέος από το ένα κύτταρο στο άλλο. Όμως, όταν η καθαρή πρωτεΐνη δε μετατρέπει τα κύτταρα-στόχους της, παρά μόνο εάν μετατραπεί στην ανενεργή της μορφή, τότε η διαφορά έγκειται αποκλειστικά στη διαδικασία επεξεργασίας της πρωτεΐνης. Συνεπώς η συγκεκριμένη διαδικασία θα πρέπει να ευθύνεται για τη μετατροπή των κυττάρων.

Η ικανότητα της ζύμης να εμφανίζει το φαινότυπο [*PSI*⁺] εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο. Η ζύμη πρέπει να είναι τύπου [*PIN*⁺], για να μπορεί να εκδηλώσει τη μορφή [*PSI*⁺]. Η εμφάνιση της κατάστασης [*PIN*⁺] αποτελεί επίσης ένα επιγενετικό φαινόμενο. Μπορεί να δημιουργηθεί μέσω του σχηματισμού πρωτεονίων που προσέρχονται από τη μετατροπή αρκετών διαφορετικών πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες μοιάζουν με τη Sup35 ως προς το ότι διαθέτουν επικράτειες πλούσιες σε αμινοξέα Gln και Asn. Η υπερέκφραση αυτών των επικρατειών στη ζύμη οδηγεί στην εκδήλωση της κατάστασης [*PSI*⁺]. Αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού για το σχηματισμό των πρωτεονίων, ο οποίος βασίζεται στη συσσωμάτωση επικρατειών Gln/Asn.

Με ποιον τρόπο η παρουσία μιας πρωτεΐνης με περιοχές Gln/Asn επηρεάζει το σχηματισμό πρωτεονίων μιας διαφορετικής πρωτεΐνης; Είναι γνωστό ότι κατά το σχηματισμό των πρωτεονίων Sup35 δε δημιουργούνται μεικτά συσσωματώματα με άλλες πρωτεΐνες. Επομένως είναι πιθανό το κύτταρο της ζύμης να περιέχει άλλες διαλυτές πρωτεΐνες που ανταγωνίζονται το σχηματισμό πρωτεονίων. Αυτές οι πρωτεΐνες δεν είναι ειδικές για ένα συγκεκριμένο πρωτεόνιο. Έτσι, η εισαγωγή οποιασδήποτε πρωτεϊνικής επικράτειας Gln/Asn που αλληλεπιδρά με αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωσή τους, διευκολύνοντας τις υπόλοιπες πρωτεΐνες Gln/Asn να συσσωρευτούν.

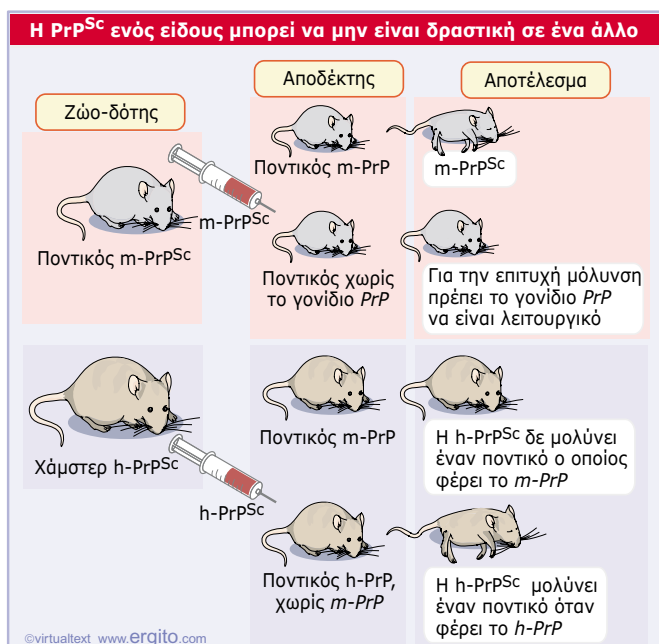
23.24 Τα πρωτεόνια προκαλούν ασθένειες στα θηλαστικά

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η πρωτεΐνη που ευθύνεται για τη νόσο scrapie απαντάται σε δύο εναλλακτικές μορφές: τη μη μολυσματική μορφή PrP^C του άγριου τύπου, η οποία είναι ευαίσθητη σε πρωτεάσες, και τη μολυσματική μορφή PrP^{Sc}, η οποία είναι ανθεκτική σε πρωτεάσες.
- ▶ Η νόσος scrapie μπορεί να μεταδοθεί στους ποντικούς εάν τους χορηγήσουμε ενέσεις καθαρής πρωτεΐνης PrP^{Sc}.
- ▶ Ο ποντικός-δέκτης θα πρέπει να φέρει ένα αντίγραφο του γονιδίου *PrP*, το οποίο κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ποντικού.
- ▶ Η πρωτεΐνη PrP^{Sc} διαιωνίζει τη μορφή της, μετατρέποντας τις αρτιγενείς πρωτεΐνες από τη μορφή PrP^C στη μορφή PrP^{Sc}.
- ▶ Τα διάφορα «στελέχη» της PrP^{Sc} μπορεί να έχουν διαφορετική πρωτεϊνική στερεοδιαμόρφωση.

Ασθένειες που οφείλονται σε πρωτεόνια έχουν χαρακτηριστεί στο πρόβατο, στον άνθρωπο και, πιο πρόσφατα, στην αγελάδα. Ο κύριος φαινότυπος είναι η αταξία (ataxia), δηλαδή μια νευροεκφυλιστική διαταραχή (neurodegenerative disorder) που εκδηλώνεται ως ανικανότητα του ατόμου να παραμείνει όρθιο. Το όνομα της ασθένειας στα πρόβατα, δηλαδή **scrapie**, αντικατοπτρίζει αυτόν ακριβώς το φαινότυπο: το πρόβατο τρίβεται στους τοίχους προκειμένου να παραμείνει όρθιο. Η νόσος scrapie μπορεί να μεταδοθεί μολύνοντας ένα υγιές πρόβατο με εκχυλίσματα ιστών ήδη μολυσμένων προβάτων. Η ανθρώπινη ασθένεια **kuru** βρέθηκε στη Νέα Γουινέα και έχει αποδειχθεί ότι διαιωνίζεται μέσω της συνήθειας του κανιβαλισμού και ιδιαίτερα της βρώσης εγκεφάλων. Το σύνδρομο Gerstmannn-Straussler αποτελεί ανάλογη κατάσταση στους δυτικούς πληθυσμούς, αλλά είναι κληρονομικό. Αντίθετα, η συγγενική της ασθένεια Creutzfeldt-Jakob (CJD) εκδηλώνεται σποραδικά. Πρόσφατα, μια ασθένεια που μοιάζει με την CJD φαίνεται να έχει μεταδοθεί στον άνθρωπο, μέσω της κατανάλωσης βοδινού κρέατος ζώων που έχουν προσβληθεί από τη λεγόμενη «ασθένεια των τρελών αγελάδων».

Όταν χορηγείται εκχύλισμα ιστού προβάτων μολυσμένων με scrapie σε ποντικούς, η ασθένεια εκδηλώνεται μέσα σε διάστημα 75-150 ημερών. Ο μολυσματικός παράγοντας είναι μια πρωτεΐνη ανθεκτική σε πρωτεάσες. Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που φυσιολογικά εκφράζεται στον εγκέφαλο. Η μορφή της πρωτεΐνης στο φυσιολογικό εγκέφαλο ονομάζεται PrP^C και είναι ευαίσθητη σε πρωτεάσες. Ωστόσο, η μετατροπή της στην ανθεκτική μορφή PrP^{Sc} σχετίζεται με την εμφάνιση της ασθένειας. Το μολυσματικό παρασκεύασμα δεν περιέχει ανιχνεύσιμο νουκλεϊκό οξύ, είναι ευαίσθητο σε ακτινοβολία UV στα μήκη κύματος που καταστρέφουν τις πρωτεΐνες και έχει χαμηλή μολυσματικότητα (1 μολυσματική μονάδα/10⁵ πρωτεΐνες PrP^{Sc}). Άρα πρόκειται για περίπτωση επιγενετικής κληρονομικότητας, κατά την οποία δε



Εικόνα 23.47 Η πρωτεΐνη PrP^{Sc} μπορεί να μολύνει ένα ζώο μόνο εάν αυτό φέρει ενδογενή πρωτεΐνη PrP^C του ίδιου τύπου.

νικές συνθήκες, η πρωτεΐνη PrP^{Sc} που απομονώνεται από ένα μολυσμένο ποντικό, όταν χορηγείται με ένεση σε έναν υγιή ποντικό-δέκτη, επάγει την ασθένεια και τελικά το θάνατο. Εάν όμως το ενδογενές γονίδιο *PrP* απενεργοποιηθεί, ο ποντικός καθίσταται ανθεκτικός στη μόλυνση. Αυτό το πείραμα οδηγεί σε δύο συμπεράσματα. Πρώτον, η ενδογενής πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη μόλυνση, πιθανότατα επειδή παρέχει την πρώτη ύλη που μετατρέπεται σε μολυσματικό παράγοντα. Δεύτερον, αιτία της ασθένειας δεν είναι η απώλεια της μορφής PrP^C της πρωτεΐνης, επειδή ένας ποντικός χωρίς PrP^C επιβιώνει κανονικά. Έτσι, η ασθένεια προκαλείται από το κέρδος λειτουργίας της PrP^{Sc}.

Η αδυναμία μετάδοσης της νόσου ανάμεσα σε διαφορετικά είδη οργανισμών επιτρέπει την κατασκευή υβριδικών πρωτεϊνών, ώστε να προσδιοριστούν εκείνες οι επικράτειες που απαιτούνται για τη μολυσματικότητα. Τα ακατέργαστα παρασκευάσματα από ιστούς ζώων με scrapie είναι δυνατόν να μεταδώσουν την ασθένεια σε άλλα είδη ζώων, αλλά αυτό δεν είναι πάντοτε εύκολο. Για παράδειγμα, οι ποντικοί είναι ανθεκτικοί στη μόλυνση με πρωτεΐνες του χάμστερ. Αυτό σημαίνει ότι η PrP^{Sc} του χάμστερ δεν μπορεί να μετατρέψει την PrP^C του ποντικού σε PrP^{Sc}. Ωστόσο, η κατάσταση αλλάζει εάν το γονίδιο *PrP* του ποντικού αντικατασταθεί με το γονίδιο *PrP* του χάμστερ. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εισάγοντας το γονίδιο *PrP* του χάμστερ σε έναν ποντικό από τον οποίο έχει αφαιρεθεί το ενδογενές γονίδιο *PrP*. Ο ποντικός που φέρει το γονίδιο *PrP* του χάμστερ είναι ευαίσθητος στη μόλυνση από την PrP^{Sc} του χάμστερ. Αυτό υποδηλώνει ότι για τη μετατροπή της κυτταρικής πρωτεΐνης PrP από τη μορφή C στη μορφή Sc θα πρέπει οι πρωτεΐνες PrP^{Sc} και PrP^C να έχουν ίδια αλληλουχία.

Υπάρχουν διαφορετικά «στελέχη» της μολυσματικής πρωτεΐνης PrP^{Sc}, τα οποία διακρίνονται ανάλογα με τη χαρακτηριστική διάρκεια περιόδου επώασης μετά τη χορήγησή τους στους ποντικούς. Αυτό υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη δεν περιορίζεται μόνο σε μία από τις

συμβαίνει καμία αλλαγή στη γενετική πληροφορία, αφού τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα μολυσμένα κύτταρα φέρουν την ίδια αλληλουχία του γονιδίου *PrP*. Ωστόσο, η μορφή PrP^{Sc} της πρωτεΐνης έχει μολυσματική δράση, ενώ η μορφή PrP^C είναι ακίνδυνη.

Η διαφορά των μορφών PrP^C και PrP^{Sc} φαίνεται να οφείλεται σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης και όχι σε ομοιοπολική τροποποίηση της πρωτεΐνης. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι γλυκοζυλιωμένες και συνδέονται με τη μεμβράνη μέσω μιας ομάδας GPI (Glycosylphosphatidylinositol, γλυκοζυλο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη). Δεν έχει παρατηρηθεί καμία αλλαγή σε αυτές τις τροποποιήσεις. Η μορφή PrP^{Sc} αποτελείται κυρίως από β-φύλλα, τα οποία απουσιάζουν από τη μορφή PrP^C.

Η δοκιμασία της μολυσματικότητας σε ποντικούς επιτρέπει να εκτιμηθεί η εξάρτηση της ασθένειας από την αλληλουχία της πρωτεΐνης. Στην **Εικόνα 23.47** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ορισμένων, σημαντικών για την κατανόηση της ασθένειας, πειραμάτων. Σε κανο-

δύο εναλλακτικές μορφές, PrP^C ή PrP^{Sc}, αλλά ότι υπάρχουν πολλαπλές διαμορφώσεις του τύπου Sc. Αυτές οι διαφορές θα πρέπει να εξαρτώνται από κάποια ιδιότητα αυτοαναπαραγωγής της πρωτεΐνης, η οποία είναι ανεξάρτητη της πρωτοταγούς δομής της. Αν η στερεοδιαμόρφωση είναι το χαρακτηριστικό που διακρίνει την PrP^{Sc} από την PrP^C, τότε θα πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές εναλλακτικές στερεοδιαμορφώσεις. Καθεμία από αυτές μπορεί να λειτουργεί ως μήτρα για την αναπαραγωγή της ίδιας της στερεοδιαμόρφωσής της, κατά τη μετατροπή της από PrP^C σε PrP^{Sc}.

Η τάση μετατροπής της PrP^C σε PrP^{Sc} εξαρτάται από μεταλλάξεις της αλληλουχίας του γονιδίου *PrP*. Το σύνδρομο Gerstmann-Straussler στον άνθρωπο προκαλείται από την αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος της PrP. Αυτή η μετάλλαξη κληρονομείται ως επικρατής χαρακτηρισ. Εάν η ίδια αλλαγή επέλθει στο γονίδιο *PrP* του ποντικού, οι ποντικοί επίσης εμφανίζουν την ασθένεια. Αυτό δείχνει ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη έχει αυξημένη πιθανότητα αυθόρμητης μετατροπής της στην κατάσταση Sc. Παρομοίως, η αλληλουχία του γονιδίου *PrP* καθορίζει την προδιάθεση του προβάτου να αναπτύξει αυθόρμητα την ασθένεια scrapie. Μάλιστα, η προδιάθεση καθορίζεται από το συνδυασμό τριών αμινοξέων (κωδικόνια 136, 154 και 171).

Το πρωτεΐνιο αντιπροσωπεύει μια ακραία περίπτωση επιγενετικής κληρονομικότητας, όπου ο μολυσματικός παράγοντας είναι μια πρωτεΐνη που μπορεί να προσλάβει πολλαπλές εναλλακτικές στερεοδιαμορφώσεις. Αυτές μπορούν να λειτουργήσουν ως μήτρα για την αναπαραγωγή πρωτεϊνών με όμοια στερεοδιαμόρφωση. Αυτή η διαδικασία πιθανότατα οδηγεί στη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που είναι καταστροφικά για το κύτταρο.

23.25 Περίληψη

Η παρουσία προεναρκτήριου συμπλόκου σε έναν υποκινητή σηματοδοτεί ότι ένα γονίδιο είναι στην «ενεργή» κατάσταση και μπορεί πλέον να μεταγραφεί. Το σύμπλοκο είναι σταθερό και μπορεί να παραμείνει στη θέση του κατά τη διάρκεια πολλών διαδοχικών κύκλων αντιγραφής. Η δυνατότητα σχηματισμού ενός προεναρκτήριου συμπλόκου φαίνεται να λειτουργεί ως ένας γενικός μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής. Με την πρόσδεσή του στον υποκινητή, το προεναρκτήριο σύμπλοκο στην ουσία ενεργοποιεί το γονίδιο, αφού επιτρέπει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης.

Η ύπαρξη υπερευαίσθητων θέσεων στο γενετικό υλικό είναι τόσο συνηθισμένη, ώστε να αποτελεί μάλλον τον κανόνα παρά την εξαίρεση. Οι ρυθμιστικές περιοχές της δίκλωνης έλικας του DNA τυπικά διατηρούνται χωρίς νουκλεοσώματα. Ο αποκλεισμός των νουκλεοσωμάτων από μια περιοχή επιτυγχάνεται μέσω της τροποποίησης της δομής της χρωματίνης από κάποιο μεταγραφικό παράγοντα ή κάποια άλλη μη ιστονική πρωτεΐνη. Η ενεργή δομή που υιοθετείται σε κάθε περίπτωση δεν είναι απαραίτητα η ίδια, εκτός, βέβαια, από την ιδιότητά της να εμφανίζει υπερευαίσθησία στην DNAάση I.

Τα γονίδια των οποίων οι ρυθμιστικές περιοχές είναι οργανωμένες σε νουκλεοσώματα συνήθως δεν εκφράζονται. Όταν δεν είναι διαθέσιμοι οι απαιτούμενοι ειδικοί ρυθμιστικοί παράγοντες για την