1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

1.1 ΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΘΕΜΑ: Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

1.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ;

1.3 Η ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΗΜΑΝΣΕΩΝ

1.4 Η ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

1.1 ΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΘΕΜΑ: Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Τα τελευταία 60 χρόνια η κληρονόμηση της γενετικής πληροφορίας που εμπεριέχεται στο DNA μας αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών και εντατικών ερευνητικών προσπαθειών, κορυφαία στιγμή των οποίων υπήρξε το Πρόγραμμα Ανάλυσης του Γονιδιώματος του Ανθρώπου (Human Genome Project, HGP). Σκοπός του προγράμματος HGP ήταν να χαρτογραφηθούν και να αλληλουχηθούν όλα τα γονίδια στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και να διαλευκανθεί το πώς καθένα απ' αυτά κατέληξε, κατά την πορεία της εξέλιξης, στη θέση που έχει στα χρωμοσώματά μας. Το πρόγραμμα ολοκληρώθηκε με επιτυχία χάρη σε μια διεθνή, συντονισμένη προσπάθεια πολλών ερευνητικών ομάδων· αποκάλυψε δε βασικές πληροφορίες που είναι απαραίτητες για να κατανοήσουμε πώς λειτουργούν τα γονίδια σε μοριακό επίπεδο. Τούτη η προσπάθεια κατανόησης της γονιδιακής λειτουργίας από μοριακή σκοπιά εμπίπτει στη λεγόμενη «μεταγονιδιωματική» εποχή· ενώ αποσκοπεί, εντέλει, στο να καταλάβουμε αφενός πώς η πληροφορία η οποία εμπεριέχεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA μπορεί να μετατραπεί σε πρωτεΐνες που δημιουργούν τις κυτταρικές δομές και αφετέρου πώς ελέγχεται η διαδικασία αυτή.

Σήμερα, οι μηχανισμοί ελέγχου των γονιδίων αποτελούν ενδεχομένως το πιο ενεργό και συναρπαστικό πεδίο μελέτης στην επιστήμη. Το ερώτημα που τίθεται είναι θεμελιώδες: Πώς ένας τύπος κυττάρου (π.χ. ένας ινοβλάστης) «γνωρίζει» ότι είναι διαφορετικός από κάποιον άλλον τύπο (π.χ. έναν νευρώνα ή ένα μυϊκό κύτταρο), δεδομένου ότι όλα αυτά τα κύτταρα περιέχουν στα γονιδιώματά τους ουσιαστικά τις ίδιες πληροφορίες για τη σύνθεση πρωτεϊνών; Τουλάχιστον εν μέρει, τούτος ο έλεγχος του κυτταρικού τύπου διαμεσολαβείται από συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι δίνουν εντολή σε κάποια γονίδια να εκφραστούν και σε άλλα να παραμείνουν σιωπηλά· αυτό, όμως, δεν μπορεί να εξηγήσει πώς ένα κύτταρο θυμάται να παραγάγει άλλα κύτταρα του ίδιου μόνον τύπου όταν διαιρείται. Κατά πάσα πιθανότητα, λοιπόν, η διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας και της λειτουργίας οφείλεται στη χρήση «επιγενετικών», όπως αποκαλούνται, μηχανισμών.

1.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ;

Φαίνεται πως ο όρος **επιγενετική** χρησιμοποιείται αναφορικά με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών παρατηρήσεων· επομένως, είναι χρήσιμο να οριστεί επακριβώς η έννοιά του. Η λέξη «επιγενετική» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1942 από τον Conrad Waddington, ο οποίος έδωσε τον εξής ορισμό: «Ένας κλάδος της Βιολογίας που μελετά τις αιτιώδεις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και των προϊόντων τους, χάρη στις οποίες διαμορφώνεται ο φαινότυπος». Βάσει των σύγχρονων πλέον δεδομένων, εύκολα μπορεί κάποιος να διαπιστώσει ότι η παραπάνω περιγραφή είναι αρκετά ευρεία, καθώς καλύπτει τους περισσότερους μηχανισμούς μέσω των οποίων μπορεί να διατηρηθούν κυτταρική ταυτότητα και λειτουργία. Ωστόσο, η θεώρηση του Waddington για την έννοια «γονίδιο» δεν βασίστηκε στις έρευνες της δεκαετίας του 1950 και του 1960. Παρ' όλα αυτά, ο αρχικός του ορισμός προσεγγίζει σε αξιοσημείωτο βαθμό τη σύγχρονη έννοια του επιγενετικού ελέγχου της γονιδιακής μεταγραφής που θα εξετάσουμε σε επόμενα κεφάλαια του ανά χείρας βιβλίου.

Οι ολοένα αυξανόμενες γνώσεις μας για τις λειτουργίες του γονιδιώματος έχουν βελτιώσει τον ορισμό της επιγενετικής· έτσι, σήμερα πια, γενικά θεωρείται ότι με τον όρο «επιγενετική» εννοούμε *τη μελέτη των αλλαγών στη γονιδιακή λειτουργία οι οποίες είναι μιτωτικά ή/και μειωτικά κληρονομήσιμες και δεν ενέχουν αλλαγή στην αλληλουχία του DNA*. Φυσικά, δεν μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο ορισμός αυτός είναι τελικός· πάντως, ακόμα και με βάση τα όσα γνωρίζουμε μέχρι στιγμής, είμαστε σε θέση να αντιληφθούμε ότι θα ήταν πιθανότατα λάθος να περιοριστεί το επίκεντρο της επιγενετικής μόνον στη «γονιδιακή» λειτουργία, αφού προκύπτουν ολοένα περισσότερες ενδείξεις ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί δύνανται να ελέγχουν τις λειτουργίες μη κωδικών αλληλουχιών του DNA (εκείνων των περιοχών του γονιδιώματος οι οποίες δεν περιέχουν αλληλουχίες που ταυτοποιούνται ως γονίδια). Παρ' όλα αυτά, για τους σκοπούς τούτης της ευρείας ανάλυσης πάνω στο θέμα της επιγενετικής, ο παραπάνω ορισμός είναι αρκούντως καλός.

1.3 Η ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΗΜΑΝΣΕΩΝ

Κυριολεκτώντας, όταν λέμε «επιγενετική», εννοούμε τη μελέτη που δεν εμπίπτει στην κλασική μελέτη της γενετικής. Μολονότι είναι απίθανο ο Waddington να επινόησε τον αρχικό του ορισμό έχοντας αυτό κατά νου, η έννοια ενός πρόσθετου ή εξωτερικού συστήματος ελέγχου (δηλαδή που δεν προέρχεται άμεσα από την αλληλουχία των βάσεων του DNA) το οποίο επιβάλλεται στα γονίδια συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με τις γνώσεις που έχουμε περί επιγενετικών τροποποιήσεων. Ο γονιδιακός έλεγχος επιτυγχάνεται μέσω ημιαντιστρεπτών ομοιοπολικών χημικών τροποποιήσεων που γίνονται στις βάσεις του DNA, αλλά και στις πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέεται το DNA μέσα στον πυρήνα του κυττάρου. Οι τροποποιήσεις αυτές, καθώς και οι επιδράσεις τους στη λειτουργία των γονιδίων και των κυττάρων, αποτελούν σημαντικό μέρος της θεματολογίας που εξετάζεται σε τούτο το βιβλίο.

1.4 Η ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Είναι γεγονός πως ένα σύστημα ικανό να ελέγχει τη γονιδιακή λειτουργία συνιστά πηγή έντονου ενδιαφέροντος για τους περισσότερους βιολόγους· εντούτοις, ορισμένα από τα πιθανά αποτελέσματα του επιγενετικού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης προσελκύουν επίσης το ενδιαφέρον πολλών ανθρώπων που δεν ασχολούνται με την επιστήμη, και τούτο λόγω του αντικτύπου που μπορεί να έχει ο τρόπος ζωής μας στην υγεία ή τη συμπεριφορά των μελλοντικών γενεών. Εκ πρώτης όψεως, αυτό φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με τις «παραδοσιακές» αρχές της γενετικής, αφού ο μεγαλύτερος όγκος των επιστημονικών δεδομένων που προέκυψαν τα πρώτα 50 χρόνια του 20ού αιώνα φάνηκε να υποδεικνύει ότι οι φαινότυποι των ζώων και των απογόνων τους καθορίζονται αποκλειστικά βάσει των γονιδίων που διαθέτουν και μεταβιβάζουν στις μελλοντικές γενεές – και, άρα, ότι οποιαδήποτε αλλαγή στον φαινότυπο θα πρέπει να οφείλεται μόνον σε μεταβολές στις αλληλουχίες του DNA των γονιδίων (συνεπώς, εμπίπτει στην ενότητα της δαρβινικής «εξέλιξης»).

Χρειάστηκε να περάσουν πολλά χρόνια μέχρι να γίνουν αποδεκτές οι θεωρίες του Δαρβίνου· η δε έννοια της εξέλιξης που πρότεινε έπρεπε να ανταγωνιστεί αρκετές ιδέες του 19ου αιώνα. Η πιο διαδεδομένη απ' αυτές τις ανταγωνιστικές υποθέσεις ήταν μάλλον η θεωρία κληρονόμησης των επίκτητων χαρακτηριστικών που δημοσιεύθηκε από τον Jean Baptiste Lamarck το 1801. Ο Lamarck πρότεινε ότι, εάν ένας οργανισμός αλλάξει τον φαινότυπό του προκειμένου να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του, οι αλλαγές αυτές μπορεί να μεταβιβαστούν στους απογόνους του. Ο Δαρβίνος, από την άλλη, υποστήριζε ότι δεν είναι δυνατόν να συμβεί κάτι τέτοιο και πως ο μοναδι-

κός τρόπος για να επέλθει φαινοτυπική αλλαγή είναι να υπάρχουν σε ορισμένους οργανισμούς παραλλαγές οι οποίες τους βοηθούν να επιβιώσουν στο περιβάλλον τους και να έχουν μεγαλύτερη επιτυχία στην παραγωγή απογόνων· επειδή δε τούτα τα χρήσιμα χαρακτηριστικά εκδηλώνονται βάσει των γονιδίων των γονέων, ο μοναδικός τρόπος για να αποκτήσουν οι απόγονοι ένα τέτοιο πλεονέκτημα επιβίωσης είναι να λάβουν αντίγραφα των γονιδίων από τους γονείς τους. Τελικά, τα στοιχεία που προέκυψαν από μελέτες γενετικής υποστήριξαν τη θεωρία του Δαρβίνου, ενώ η θεωρία του Lamarck απορρίφθηκε· διαμορφώθηκε έτσι, κατ' επέκταση, ένα κεντρικό δόγμα της βιολογίας του 20ού αιώνα, σύμφωνα με το οποίο αφενός τα χαρακτηριστικά μεταβιβάζονται αποκλειστικά μέσω της κληρονόμησης γονιδίων και αφετέρου τα γονίδια δεν μπορούν να επηρεαστούν από εξωτερικά συμβάντα. Η πεποίθηση αυτή φάνηκε εύλογη: έμοιαζε λογικό ότι κάτι «κακό» που είχε συμβεί στη διάρκεια της ζωής του παππού ενός ατόμου δεν μπορούσε να έχει καμία επίδραση στην υγεία του ίδιου. Ωστόσο, ορισμένα από τα πιο καταστροφικά ιστορικά γεγονότα του 20ού αιώνα φαίνεται να υποδηλώνουν ακριβώς το αντίθετο.

Οι επιγενετιστές συχνά αναφέρονται στον «Ολλανδικό Χειμώνα της Πείνας» του 1944, ένα συμβάν που έλαβε χώρα στη διάρκεια του Β′ Παγκοσμίου Πολέμου (θα αναφερθούμε σε τούτο το γεγονός στα κεφάλαια που περιγράφουν την επίδραση των επιγενετικών μηχανισμών σε ποικίλες ασθένειες). Ο Χειμώνας της Πείνας υπήρξε αποτέλεσμα του αποκλεισμού που είχαν επιβάλει οι Γερμανοί στις μεταφορές τροφίμων και καυσίμων στη δυτική Ολλανδία, από τον Σεπτέμβριο του 1944 μέχρι την απελευθέρωση της χώρας από τη ναζιστική κυριαρχία τον Μάιο του 1945. Ο αποκλεισμός αυτός, σε συνδυασμό με τις αντίξοες καιρικές συνθήκες του χειμώνα, προκάλεσαν λιμό και οδήγησαν σε μεγάλο αριθμό θανάτων. Επειδή το συγκεκριμένο ιστορικό συμβάν τεκμηριώθηκε πολύ καλά, μπορέσαμε εκ των υστέρων να αξιολογήσουμε τις επιπτώσεις της πείνας στην υγεία του ανθρώπου. Τα αποτελέσματα πολλών από τις σχετικές μελέτες που έγιναν υποδεικνύουν ότι η ασιτία των έγκυων γυναικών σχετίζεται με την υγεία των απογόνων τους. Σε αρκετές επιδημιολογικές έρευνες διαπίστωθηκε ότι τα παιδιά που είχαν γεννηθεί από τέτοιες γυναίκες ήταν πιο ευαίσθητα σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, οι καρδιακές παθήσεις και η παχυσαρκία από ό,τι τα παιδιά των μητέρων που είχαν τραφεί κανονικά. Επιπλέον, φάνηκε πως οι ψυχικές ασθένειες όπως η σχιζοφρένεια ήταν πιο διαδεδομένες μεταξύ των παιδιών που είχαν γεννηθεί από γυναίκες κατά τον Χειμώνα της Πείνας. Ακόμα μεγαλύτερη έκπληξη προκαλεί το γεγονός ότι παρόμοιες τάσεις εκδήλωσης ασθενειών παρατηρήθηκαν τελικά και στα *εγγόνια* των γυναικών που είχαν τεκνοποιήσει την περίοδο του Χειμώνα της Πείνας – αυτό αντικρούει τον πιθανό ισχυρισμό ότι η ασιτία της μητέρας θα μπορούσε απλώς να έχει οδηγήσει σε αλλοίωση της ανάπτυξης του αγέννητου εμβρύου της. Τούτα τα στοιχεία φαίνεται πως υποδηλώνουν ότι η διατροφή μιας γιαγιάς μπορεί να επηρεάσει την υγεία αρκετών γενεών, γεγονός που με τη σειρά του υποδεικνύει ότι κάποια προσαρμογή στο περιβάλλον της έχει δημιουργήσει ένα κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό – κάτι που υποτίθεται πως δεν συμβαίνει εάν δεχτούμε ότι η δαρβινική εξέλιξη είναι η μοναδική αιτία φαινοτυπικής αλλαγής.

Ακόμα και έτσι, όμως, θα ήταν δελεαστικό να ισχυριστεί κάποιος ότι ο υποσιτισμός της μητέρας ήταν εκείνος που έβλαψε το αναπτυσσόμενο έμβρυο προκαλώντας κάποια μορφή ζημιάς στα γονίδια του παιδιού, εισάγοντας στις αλληλουχίες του DNA μεταλλάξεις των οποίων οι βλαβερές συνέπειες έγιναν εμφανείς μόνον αργότερα, στην ενήλικη ζωή. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν κάτι διαφορετικό: Βασιζόμενες στα ευρήματα του Ολλανδικού Χειμώνα της Πείνας, κάποιες σύγχρονες μελέτες επικεντρώθηκαν στα προβλήματα που εμφανίζουν τα παιδιά ανδρών οι οποίοι είτε είναι παχύσαρκοι είτε έχουν υποφέρει από ασιτία. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του προτύπου των επιγενετικών σημάνσεων (κυρίως μεθυλιώσεις του DNA) στο γονίδιο του αυξητικού παράγοντα *IGF2* και του δείκτη σωματικής μάζας του πατέρα: Σε νεογνά που γεννιούνται από ζευγάρια στα οποία ο πατέρας είναι παχύσαρκος, παρατηρείται υπομεθυλίωση του γονιδίου. Τούτα τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι και η θρεπτική κατάσταση του πατέρα μπορεί να επηρεάσει την υγεία των παιδιών – αυτή η επίδραση θα μπορούσε να μεταβιβαστεί στο παιδί μόνον μέσω των σπερματοζωαρίων του πατέρα. Μολονότι είναι επίσης πιθανό η πείνα ή η παχυσαρκία του πατέρα να εισήγαγε μεταλλάξεις στο δικό του γονίδιο *IGF2* πριν από τη σύλληψη του παιδιού, φαίνεται απίθανο να συνέβησαν σε όλα τα παχύσαρκα άτομα παρόμοιες μεταλλάξεις οι οποίες οδήγησαν σε παρόμοια υπομεθυλίωση του *IGF2* στους απογόνους τους. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι υπομεθυλίωση του *IGF2* παρατηρήθηκε επίσης στα παιδιά των γυναικών του Χειμώνα της Πείνας, ακόμα και έξι δεκαετίες μετά τη γέννησή τους το 1944-1945. Συνεπώς, υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που υποστηρίζουν την απόκτηση κληρονομήσιμων χαρακτηριστικών ως αποτέλεσμα της διατροφικής κατάστασης των γονέων.

Υπάρχουν, βέβαια, και άλλες ασθένειες οι οποίες θεωρείται ότι έχουν επιγενετική βάση, ανεξάρτητα από το πόσο καλά τρέφονται οι γονείς ενός παιδιού. Ας δούμε το παράδειγμα του καρκίνου του μαστού: Έχει παρατηρηθεί ότι μόνον το 10% των καρκίνων του μαστού που εντοπίζονται σε οικογένειες μπορεί να συνδεθεί με γνωστές γενετικές μεταλλάξεις. Έχει βρεθεί ότι από την έκθεση έγκυων αρουραίων σε παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού στους ανθρώπους (π.χ. διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά ή το συνθετικό οιστρογόνο αιθινυλική οιστραδιόλη) προκύπτουν θηλυκοί απόγονοι οι οποίοι εμφανίζουν όγκους στον μαστό συχνότερα από ό,τι οι απόγονοι των αρουραίων που δεν έχουν εκτεθεί σε τέτοιους παράγοντες κινδύνου. Παρουσιάζει δε ενδιαφέρον ότι ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού δεν φαίνεται να είναι μόνιμος, τουλάχιστον για κάποιους από τους παράγοντες κινδύνου: Έχει διαπιστωθεί, λόγου χάρη, ότι οι δισέγγονες των αρουραίων που εκτίθενται σε διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά δεν παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης όγκων από ό,τι οι δισέγγονες των έγκυων αρουραίων ελέγχου. Οι επιδράσεις της αιθινυλικής οιστραδιόλης, ωστόσο, φαίνεται να είναι μεγαλύτερης διάρκειας, αφού οι δισέγγονες παρουσιάζουν επίσης αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου.

Δεν γνωρίζουμε τους ακριβείς μηχανισμούς μέσω των οποίων η χημική έκθεση μπορεί να μεταβάλει το πρότυπο των επιγενετικών τροποποιήσεων στο γονιδίωμα ενός ζώου – αυτός είναι και ένας από τους λόγους για τον οποίο η επιγενετική αποτελεί ένα τόσο συναρπαστικό και δυνητικά γόνιμο πεδίο έρευνας. Εξάλλου, αν πράγματι ορισμένες περιβαλλοντικές εκθέσεις ή πρότυπα συμπεριφοράς των προηγούμενων γενεών μπορούν να επηρεάσουν την υγεία της σημερινής γενεάς, τότε η τροποποίηση αυτών των εκθέσεων ή συμπεριφορών στη σημερινή γενεά μπορεί να βελτιώσει την υγεία της επόμενης. Ακόμα καλύτερα, εάν καταφέρουμε να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς μέσω των οποίων γεγονότα όπως ο Ολλανδικός Χειμώνας της Πείνας προδιαθέτουν σε ασθένειες τους απογόνους όσων επηρεάζονται από αυτά, θα μπορέσουμε ενδεχομένως να αναπτύξουμε μεθόδους ώστε να προλαμβάνεται η συσσώρευση βλαβερών επιγενετικών αλλαγών και να μειώνεται ο κίνδυνος ασθενειών, ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές επιρροές – κάτι τέτοιο θα μπορούσε να έχει πραγματικά σημαντικότατο αντίκτυπο στην υγεία και την ευημερία του ανθρώπου.

ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ

Bird A (2013) Epigenetics: discovery. *New Sci* 217:ii-iii (doi:10.1016/S0262-4079(13)600305).

Burgess DJ (2013) Epigenetics: mechanistic insight into epigenetic inheritance. *Nat Rev Genet* 14:442 (doi:10.1038/nrg3525).

Eichten S & Borevitz J (2013) Epigenomics: methylation's mark on inheritance. *Nature* 495:181-182 (doi:10.1038/nature11960).

Hanson MA, Low FM & Gluckman PD (2011) Epigenetic epidemiology: the rebirth of soft inheritance. *Ann Nutr Metab* 58 (Suppl 2):8-15 (doi:10.1159/000328033).

Hardison RC (2012) Genome-wide epigenetic data facilitate understanding of disease susceptibility association studies. *J Biol Chem* 287:30932-30940 (doi:10.1074/jbc.R112.352427).

Ferguson-Smith AC & Patti ME (2011) You are what your dad ate. *Cell Metab* 13:115-117 (doi:10.1016/j.cmet.2011.01.011).

Greer EL & Shi Y (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13:343-357 (doi:10.1038/nrg3173).

Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD et al. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17046-17049 (doi:10.1073/pnas.0806560105).

Hesman Saey T (2013) From great grandma to you. *Science News* 183:18-21 (doi:10.1002/scin.5591830718).

Grossniklaus U, Kelly B, Ferguson-Smith AC et al. (2013) Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? *Nat Rev Genet* 14:228-235 (doi:10.1038/nrg3435).

Ho MW & Saunders PT (1979) Beyond neo-Darwinism—an epigenetic approach to evolution. *J Theor Biol* 78:573-591 (doi:10.1016/0022-5193(79)90191-7).

Gruenert DC & Cozens AL (1991) Inheritance of phenotype in mammalian cells: genetic vs. epigenetic mechanisms. *Am J Physiol* 260:L386-L394.

Maynard Smith J (1990) Models of a dual inheritance system. *J Theor Biol* 143:41-53 (doi:10.1016/S0022-5193(05)80287-5).

Hackett JA & Surani MA (2013) Beyond DNA: programming and inheritance of parental methylomes. *Cell* 153:737-739 (doi:10.1016/j.cell.2013.04.044).

Hackett JA & Surani MA (2013) DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Phil Trans R Soc B* 368:20110328 (doi:10.1098/rstb.2011.0328).

Moazed D (2011) Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 146:510-518 (doi:10.1016/j.cell.2011.07.013).

Monk M (1990) Variation in epigenetic inheritance. *Trends Genet* 6:110-114.

Roberts AR, Huang E, Jones L et al. (2013) Non-telomeric epigenetic and genetic changes are associated with the inheritance of

shorter telomeres in mice. *Chromosoma* Jul 18 [Epub ahead of print] doi:10.1007/s00412-013-0427-8).

Sarkies P & Sale JE (2012) Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends Genet* 28:118-127 (doi:10.1016/j.tig.2011.11.005).

Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A et al. (2013) Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med* 11:29 (doi:10.1186/1741-7015-11-29).

Shea N, Pen I & Uller T (2011) Three epigenetic information channels and their different roles in evolution. *J Evol Biol* 24:1178-1187 (doi:10.1111/j.1420-9101.2011.02235.x).

Thayer ZM & Kuzawa CW (2011) Biological memories of past environments: epigenetic pathways to health disparities. *Epigenetics* 6:798-803 (doi:10.4161/epi.6.7.16222).

Shiota H, Goudarzi A, Rousseaux S & Khochbin S (2013) Transgenerational inheritance of chromatin states. *Epigenomics* 5:121-122 (doi:10.2217/epi.13.12).

Xu M, Wang W, Chen S & Zhu B (2011) A model for mitotic inheritance of histone lysine methylation. *EMBO Rep* 13:60-67 (doi:10.1038/embor.2011.206).

Skinner MK, Haque CG, Nilsson E et al. (2013) Environmentally induced transgenerational epigenetic reprogramming of primordial germ cells and the subsequent germ line. *PLoS One* 8:e66318 (doi:10.1371/journal.pone.0066318).

2

Η ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

2.1 Η ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

2.2 ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΑΤΑ

2.3 ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΕΝΑΡΚΤΗΡΙΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ

2.4 ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Μολονότι τα γονιδιώματα σχεδόν όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν χιλιάδες γονίδια, μόνον ένα μέρος αυτών μεταγράφεται ενεργά ανά πάσα στιγμή. Το ποια ακριβώς γονίδια είναι ενεργά εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και το στάδιο του μιτωτικού (ή μειωτικού) κύκλου στο οποίο βρίσκεται, τις περιβαλλοντικές επιδράσεις σε μεμονωμένα κύτταρα, ακόμα και την ηλικία του εκάστοτε κυττάρου σε σχέση με τα γειτονικά του. Σε μονοκύτταρους ευκαρυώτες, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, η διατήρηση του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης είναι μια διαδικασία αρκετά περίπλοκη· φανταστείτε, λοιπόν, πόσο πιο σύνθετη είναι σε πολυκύτταρους οργανισμούς, στους οποίους τα περισσότερα κύτταρα έχουν μεν το ίδιο ακριβώς γονιδίωμα, χρειάζεται όμως να εκφράσουν πολύ διαφορετικά γονίδια προκειμένου να εκτελέσουν συγκεκριμένη λειτουργία. Για να αποφασιστεί ποιες πληροφορίες του γονιδιώματος θα χρησιμοποιηθούν, τίθεται σε εφαρμογή μια πολύπλοκη διεργασία: η επιγενετική τροποποίηση του γονιδιώματος που έχει εξελιχθεί ακριβώς για να λαμβάνονται τέτοιου είδους αποφάσεις. Επειδή, λοιπόν, πολλές απ' αυτές τις επιγενετικές τροποποιήσεις επηρεάζουν την ικανότητα των γονιδιακών υποκινητών να σηματοδοτήσουν την έναρξη της μεταγραφής, κρίνουμε σκόπιμο, προτού αναλύσουμε τη μοριακή βάση του επιγενετικού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης, να κάνουμε μια σύντομη επισκόπηση της διαδικασίας της μεταγραφής.

2.1 Η ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

Στόχος της γονιδιακής μεταγραφής είναι να παραχθούν ριβονουκλεϊκά οξέα (ribonucleic acid, RNA)· ο ακριβής τύπος του RNA που θα παραχθεί, ωστόσο, εξαρτάται από τη φύση του εκάστοτε μεταγραφόμενου γονιδίου. Ρόλος πολλών μορίων RNA είναι να μεταβιβάζουν πληροφορίες από το γονιδίωμα (DNA), προκειμένου να γίνει η σύνθεση των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την εκτέλεση βιοχημικών ή δομικών λειτουργιών στο κύτταρο – εξ ου και το μάλλον προφανές όνομά τους, **αγγελιοφόρο RNA** (messenger RNA, **mRNA**). Υπάρχουν, όμως, και άλλοι τύποι μορίων RNA που είναι επιφορτισμένοι με πολύ διαφορετικούς ρόλους. Τα **μεταφορικά RNA** (transfer RNA, **tRNA**), λόγου χάρη, μεταφέρουν στα ριβοσώματα αμινοξέα τα οποία ενσωματώνονται σε επιμηκυνόμενα πολυπεπτίδια, ενώ τα ίδια τα ριβοσώματα αποτελούνται σε μεγάλο βαθ-

μό από **ριβοσωματικό RNA** (ribosomal RNA, **rRNA**). Υπάρχουν, επίσης, ολοένα αυξανόμενες ενδείξεις ότι και άλλα RNA –τα αποκαλούμενα **μη κωδικά RNA** (non-coding RNA, **ncRNA**)– παίζουν κάποιον ρόλο στη ρύθμιση του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης.

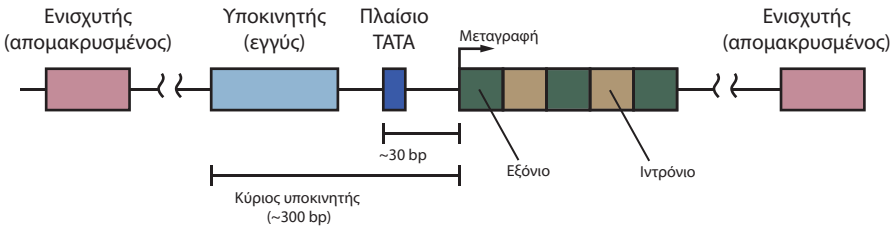
Οι διάφοροι τύποι RNA συντίθενται από τρία διαφορετικά ένζυμα *RNA πολυμεράσης*, τα οποία αποτελούνται από πολλαπλές πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Οι γνώσεις μας για το πώς αλληλεπιδρούν και λειτουργούν όλες αυτές οι υπομονάδες εξακολουθούν να είναι ελλιπείς. Εκείνο που γνωρίζουμε, ωστόσο, είναι ότι όλες οι πολυμεράσες διαθέτουν μια παρόμοια καταλυτική πρωτεϊνική επικράτεια (γεγονός που δεν προκαλεί έκπληξη, αφού όλες συνθέτουν RNA)· οι άλλες επικράτειες πιθανότατα εμπλέκονται στην αναγνώριση, σε παρακείμενες αλληλουχίες DNA, των στοιχείων εκείνων που «σηματοδοτούν» ότι το γονίδιο προορίζεται για μεταγραφή από έναν συγκεκριμένο τύπο πολυμεράσης (τέτοια στοιχεία είναι π.χ. οι ενισχυτές, οι υποκινητές και διάφορες γονιδιοειδικές αλληλουχίες). Με άλλα λόγια, στην αλληλουχία του DNA κωδικοποιούνται χαρακτηριστικά τα οποία διακρίνουν τα γονίδια που προορίζονται για την παραγωγή μορίων mRNA από εκείνα που προορίζονται για τη σύνθεση μορίων tRNA και rRNA.

Η μεταγραφή ελέγχεται έως έναν βαθμό από την *υποκυτταρική τοποθεσία* τής κάθε πολυμεράσης. Παραδείγματος χάριν, η **RNA πολυμεράση I** εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον *πυρηνίσκο*, μια μικρή κυστοειδή δομή μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, ρόλος της οποίας είναι η συγκρότηση των ριβοσωμάτων. Η διεργασία της ριβοσωματικής συγκρότησης είναι ιδιαίτερα απαιτητική, και τούτο διότι από την επιτυχή σύνθεση των ριβοσωμάτων εξαρτάται όλη η υπόλοιπη μεταγραφική δραστηριότητα ενός κυττάρου· στην πραγματικότητα, η μεταγραφή των rRNA από την RNA πολυμεράση I στο εσωτερικό του πυρηνίσκου αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής σύνθεσης RNA. Αντιθέτως, η **RNA πολυμεράση II** εδράζεται στο *πυρηνόπλασμα* (το τμήμα του πυρήνα που δεν είναι πυρηνίσκος)· ρόλος της είναι να παράγει ετερογενές πυρηνικό RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA), δηλαδή τον πρόδρομο του mRNA. Η ενεργότητα της RNA πολυμεράσης II ενδεχομένως ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος της υπόλοιπης κυτταρικής σύνθεσης RNA, συμπεριλαμβανομένης εκείνης των microRNA, τα οποία μάλλον προκύπτουν από τη διάσπαση πολύ μεγαλύτερων μορίων RNA που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Τα μεταφορικά RNA και άλλα μικρά RNA συντίθενται από την **RNA πολυμεράση III**, η οποία επίσης εδράζεται στο *πυρηνόπλασμα*, γεγονός που υποδηλώνει ότι από μόνη της η θέση της RNA πολυμεράσης στο εσωτερικό του κυττάρου δεν είναι επαρκής για να διαφοροποιηθούν οι ενεργότητες των τριών ενζύμων ως προς τη σύνθεση των διαφόρων RNA.

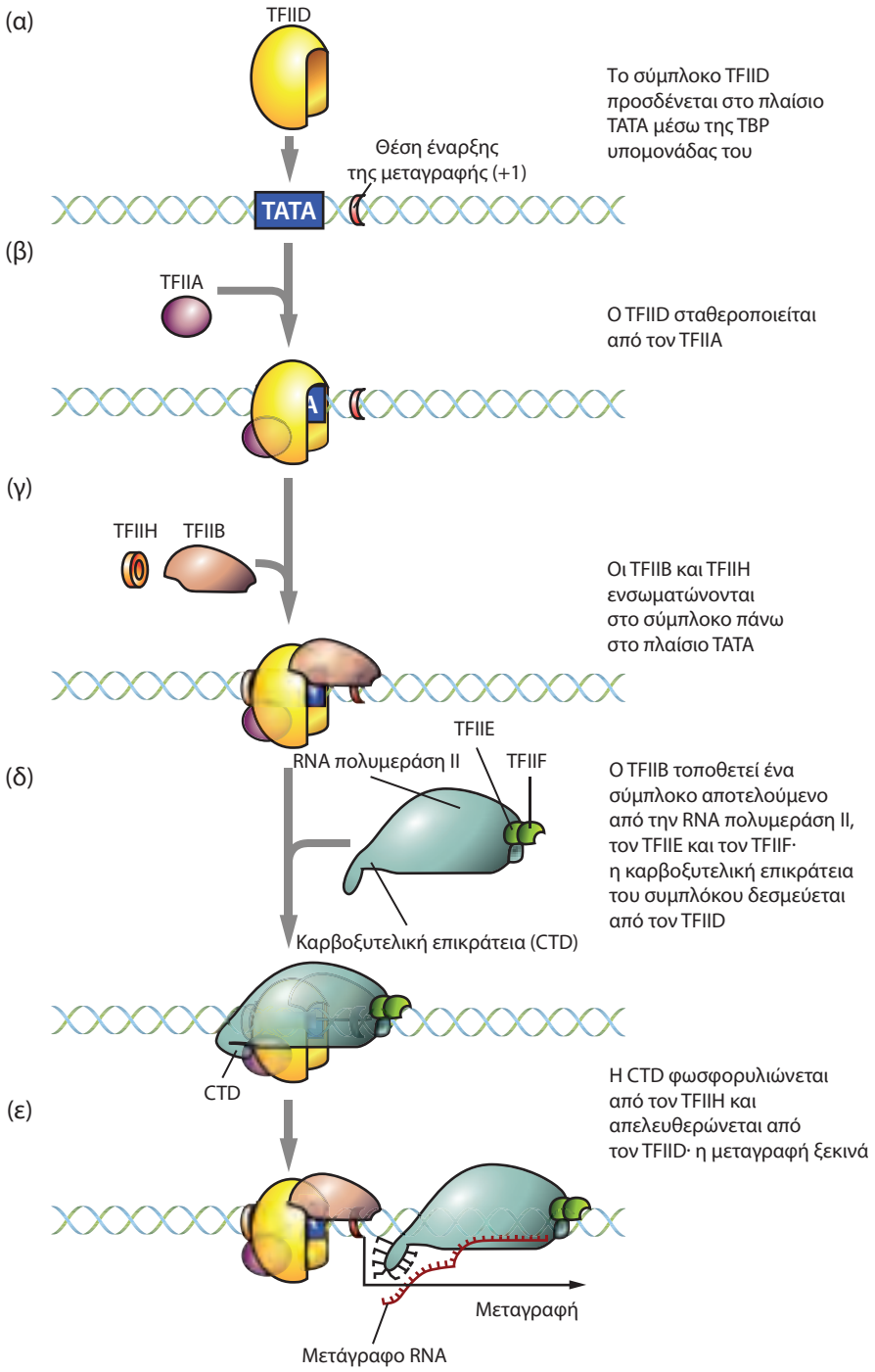
2.2 ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΛΑΙΣΙΑ TATA

Η εξειδίκευση των RNA πολυμερασών έγκειται στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν, μέσα στα γονίδια, στοιχεία αλληλουχίας που είναι γνωστά ως **υποκινητές**. Στην ουσία, ο υποκινητής είναι μια εξειδικευμένη περιοχή στην αλληλουχία του DNA η οποία είναι διακριτή από τη διάταξη των ζευγών βάσεων που κωδικοποιούν την ακολουθία αμινοξέων που απαιτούνται για να παραχθεί το γονιδιακό προϊόν. Μπορεί να οριστεί ακριβέστερα ως *μια ρυθμιστική περιοχή τού DNA η οποία πιθανώς –αλλά όχι κατ' ανάγκην– εδράζεται ανοδικά (πριν από) της κωδικής αλληλουχίας και η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή των περιοχών του γονιδίου που κωδικοποιούν πολυπεπτίδιο*. Συχνά οι υποκινητές βρίσκονται πολύ κοντά στα ζεύγη βάσεων του DNA που αποτελούν το πρώτο κωδικόνιο της κωδικής αλληλουχίας (τη θέση έναρξης της μεταγραφής)· αυτό, βέβαια, δεν ισχύει πάντοτε – υπάρχουν, εν ολίγοις, και κάποια γονίδια των οποίων ο υποκινητής βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση από τη θέση έναρξης της μεταγραφής. Επίσης, πολλές φορές, στους ευκαρυώτες υπάρχουν μέσα ή κοντά στους υποκινητές αρκετές περιοχές DNA, λειτουργία των οποίων είναι είτε να αυξομειώνουν την ταχύτητα της μεταγραφής, δηλαδή να την επιταχύνουν ή να την επιβραδύνουν, είτε να τη σταματούν εντελώς σε περίπτωση που ανακύψουν συγκεκριμένες συνθήκες στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή ακριβώς η πολυπλοκότητα και η πολυμορφία καθιστούν δύσκολη τη διατύπωση ενός καθολικού ορισμού για την έννοια του ευκαρυωτικού υποκινητή. Εκείνο που αδιαμφισβήτητα μπορούμε να πούμε, όμως, είναι ότι οι υποκινητές ευθύνονται για την έναρξη της μεταγραφής στη σωστή θέση.

Πολλοί από τους υποκινητές (αλλά σε καμία περίπτωση όλοι) διαθέτουν μια αλληλουχία, το λεγόμενο **στοιχείο TATA** (ή **πλαίσιο TATA**), το οποίο βρίσκεται περίπου 30-50 ζεύγη βάσεων μακριά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (**Εικόνα 2.1**). Το πλαίσιο TATA χρησιμεύει για την προσέλκυση («στρατολόγηση») μιας συγκεκριμένης **πρωτεΐνης δέσμευσης στο πλαίσιο TATA** (TATA box binding protein, **TBP**) η οποία αποτελεί μέρος του πρωτεϊνικού συμπλόκου που γενικά αναφέρεται ως **παράγοντας μεταγραφής IID** (transcription factor IID, **TFIID**). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.2**, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο πλαί-



Εικόνα 2.1 Τυπική διάταξη ενός ευκαρυωτικού γονιδίου mRNA. Εδώ παρουσιάζονται η κοινώς αποδεκτή θέση του πλαισίου TATA, καθώς και οι πιθανές θέσεις άλλων στοιχείων ελέγχου όπως οι υποκινητές και οι ενισχυτές. Συνήθως το πλαίσιο TATA βρίσκεται εντός του κύριου υποκινητή· λειτουργεί δε ως θέση πρόσδεσης για την TBP. Η πρόσδεση της TBP επιτρέπει τη συγκρότηση της μεταγραφικής μηχανής στη σωστή θέση για να ξεκινήσει η μεταγραφή. Η κατεύθυνση προς την οποία μεταγράφεται το γονίδιο υποδεικνύεται με το μαύρο βέλος στην αρχή του πρώτου εξονίου. bp, ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 2.2 Η συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου (PIC). Η μεταγραφή απαιτεί τον σχηματισμό, στο πλαίσιο TATA, ενός προεναρκτήριου συμπλόκου πρωτεϊνών που περιλαμβάνει την πολυμεράση και ποικίλες πρωτεΐνες TFII. (α) Η συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου ξεκινά όταν στο πλαίσιο TATA προσελκύεται μια ειδική πρωτεΐνη, η TBP, η οποία αποτελεί μέρος του πρωτεϊνικού συμπλόκου TFIID. (β, γ) Η TBP προσελκύει τον παράγοντα TFIIB στο σύμπλοκο TFIID (και, εάν υπάρχει, τον TFIIA). (δ) Αυτό το αυξανόμενο σύμπλοκο πρωτεϊνών ουσιαστικά διαμορφώνει μια θέση πρόσδεσης για την πολυμεράση. Ωστόσο, προτού ενσωματωθεί στο προεναρκτήριο σύμπλοκο, η RNA πολυμεράση II συνδέεται με τον TFIIF και, ακολούθως, προσελκύονται αμφότεροι από τον TFIIB. (ε) Τέλος, η RNA πολυμεράση II προσελκύει τον TFIIE, ο οποίος επιστρατεύει, στη συνέχεια, τον TFIIH, προκειμένου να ολοκληρωθεί η συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου.

σιο TATA και στον TFIID σταθεροποιείται από την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IIA (TFIIA), ο οποίος φαίνεται ότι προάγει την προσέλκυση και άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Ουσιαστικά, τούτο το σύνολο πρωτεϊνών που «κάθεται» πάνω στο πλαίσιο TATA διαμορφώνει μια θέση στην οποία μπορεί να προσκολληθεί η RNA πολυμεράση II. Αυτός ο μηχανισμός έναρξης, ο οποίος περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός συμπλόκου που περιέχει RNA πολυμεράση, σε οποιονδήποτε γονιδιακό υποκινητή (ριβοσωματικού RNA, μη κωδικού ή κωδικού mRNA), με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων, είναι κοινός για όλες τις RNA πολυμεράσες, αν και η προσέλκυση πρωτεϊνών σε ένα πλαίσιο TATA συμβαίνει μόνον στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τελικά, αφού φωσφορυλιωθεί η καρβοξυτελική της επικράτεια (συμβάν που ουσιαστικά «απαγκιστρώνει» την πολυμεράση από τη θέση προσκόλλησης), η RNA πολυμεράση II μπορεί να προχωρήσει κατά μήκος του DNA, παράγοντας το RNA μετάγραφο καθώς μετακινείται.

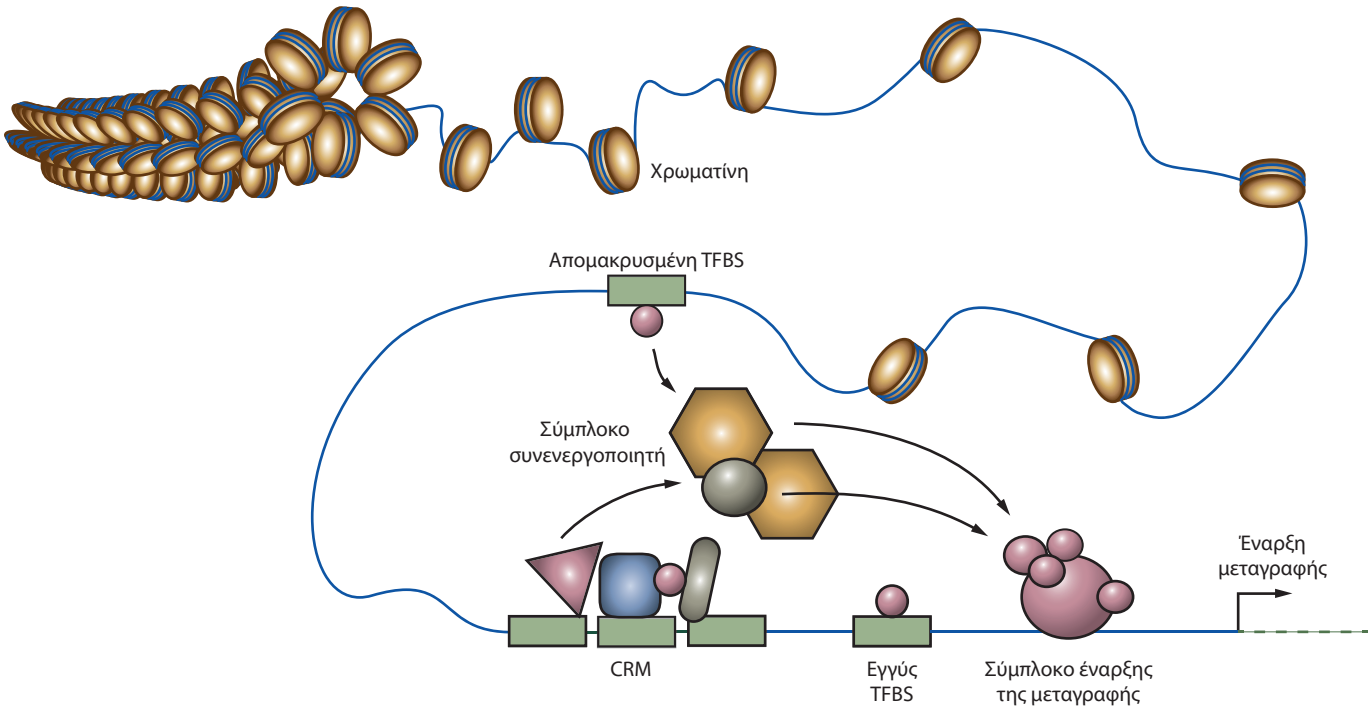
Η παραπάνω περιγραφή σχετικά με την ενεργότητα των RNA πολυμερασών συνιστά, ωστόσο, μια υπεραπλουστευμένη παρουσίαση. Κατά πάσα πιθανότητα υπάρχουν εκατοντάδες, αν όχι χιλιάδες, γονίδια τα οποία έχουν πλαίσια TATA σε λίγο πολύ παρόμοιες θέσεις ως προς τη θέση έναρξης της μεταγραφής· πώς, λοιπόν, γνωρίζει το κύτταρο ποια γονίδια πρέπει να μεταγράψει; Μεγάλο μέρος τούτης της εξειδίκευσης φαίνεται ότι βασίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της TBP και των **παραγόντων που προσδένονται στην TBP** (TBP-associated factors, **TAF**) – αν και μάλλον δεν συμβαίνει κάποια απευθείας πρόσδεση των ίδιων των TAF σε σημαντικές και γονιδιοειδικές περιοχές της αλληλουχίας του υποκινητή.

Η δράση των TAF φαίνεται πως ουσιαστικά σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ *άλλων μεταγραφικών παραγόντων* (που αποκαλούνται έτσι ελλείψει καλύτερης περιγραφής) οι οποίοι δεσμεύονται, πράγματι, σε πολύ συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή του υποκινητή. Εάν, μάλιστα, όλοι αυτοί οι παράγοντες βρίσκονται στις σωστές θέσεις στον υποκινητή του γονιδίου, μπορούν να αλληλεπιδράσουν έτσι ώστε να διασφαλίσουν ότι η TBP θα παραμείνει στη θέση της μέχρις ότου προσελκυθεί και η RNA πολυμεράση.

2.3 ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΕΝΑΡΚΤΗΡΙΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ

Επειδή οι επιμέρους θέσεις πρόσδεσης αρκετών γονιδιοειδικών μεταγραφικών παραγόντων συχνά βρίσκονται αρκετά μακριά από το πλαίσιο TATA, για να συγκροτηθεί το **προεναρκτήριο σύμπλοκο** (pre-initiation complex, **PIC**) είναι πολλές φορές αναγκαίο να καμφθεί το DNA του υποκινητή ώστε να δημιουργηθεί ένας βρόχος, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.3**. Κατά πάσα πιθανότητα, η παραμόρφωση του DNA του υποκινητή από το PIC δεν είναι μια απλή διεργασία, και τούτο διότι, όντας ενεργειακά μη ευνοϊκή, ενέχει κάποια κυτταρική δαπάνη ενέργειας. Αυτό υποδηλώνει ότι είναι προς το συμφέρον του κυττάρου να συμμετέχει σε τούτη τη δραστηριότητα. Εάν, φέρ' ειπείν, έτσι επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη γονιδιακή έκφραση, τότε η ενεργειακή «επένδυση» αξίζει τον κόπο, αφού τα ειδικά και επακριβώς ελεγχόμενα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης αποτελούν τους «θεμέλιους λίθους» της κυτταρικής ταυτότητας που επιτρέπουν την εκτέλεση των διαφόρων λειτουργιών στον οργανισμό.

Ας σημειωθεί εδώ ότι όλες οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων δεν μπορεί να εντοπίζονται στην ίδια περιοχή του DNA, αφού σε μια τέτοια περίπτωση θα ήταν εξαιρετικά δύσκολο να επιτευχθεί η δημιουργία βρόχου μέσω της κάμψης του DNA. Μπορεί, πάντως, να συναχθεί ότι, από τη στιγμή που θα σχηματιστεί, ο βρόχος με κάποιον τρόπο σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της RNA πολυμεράσης με το DNA (τη θέση του υποκινητή όπου δεσμεύεται το προεναρκτήριο σύμπλοκο που περιλαμβάνει την TBP και τους TAF). Αυτό φαίνεται να υποστηρίζεται από μια ενδιαφέρουσα πρόσφατη ένδειξη: Έχει δειχθεί ότι, για μερικά γονίδια, η επίδραση με αντινοηματικά ολιγονουκλεοτίδια μπορεί στην πραγματικότητα να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Οι αντινοηματικές τεχνικές αποτελούν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο για τη μείωση της σύνθεσης των γονιδιακών προϊόντων, μια και η εισαγωγή μιας αλληλουχίας RNA στο κύτταρο μπορεί να παρεμποδίσει την επεξεργασία του ομόλογου mRNA στα ριβοσώματα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα αντινοηματικά ολιγονουκλεοτίδια συνδέονται με το φυσιολογικό νοηματικό mRNA μέσω του κατά Watson-Crick ζευγαρώματος των βάσεών τους, προκειμένου να σχηματίσουν ένα τρίκλωνο μόριο («triplex») το οποίο δεν αναγνωρίζεται πλέον από το ριβόσωμα. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής που παρατηρείται σε ορισμένες περιπτώσεις φαίνεται ότι προκύπτει όταν υπάρχει κάποιος βαθμός ομοιότητας στην αλληλουχία ανάμεσα στο αντινοηματικό ολιγονουκλεοτίδιο και σε τμήματα της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου (αυτό πιθανώς να επιτρέπει στο ολιγονουκλεοτίδιο να «εισβάλει» στο δίκλωνο DNA στη συγκεκριμένη θέση, ώστε να σχηματιστεί ένα τρίκλωνο μόριο). Δημιουργείται έτσι στον υποκινητή ένα «εξόγκωμα» (ο λεγόμενος **D-βρόχος**), το οποίο φαίνεται ότι μοιάζει με τον



Εικόνα 2.3 Οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων (transcription factor binding sites, TFBS) συχνά βρίσκονται σε μεγάλες μεταξύ τους αποστάσεις· επομένως, για να έρθουν κοντά αυτά τα στοιχεία, το DNA πρέπει να σχηματίσει βρόχους. CRM (Cis-Regulatory Module): cis-ρυθμιστικό στοιχείο. [Προσαρμοσμένη από Wasserman WW & Sandelin A (2004) *Nat. Rev. Genet.* 5, 276. Κατόπιν αδείας από Macmillan Publishers Ltd.]

βρόχο που διαμορφώνεται κατά τον σχηματισμό τού εναρκτήριου συμπλόκου και οδηγεί στην προσέλκυση της RNA πολυμεράσης II και την επακόλουθη σύνθεση του μεταγράφου RNA.

Θα πρέπει εδώ να επισημανθεί επίσης ότι πολλά γονίδια δεν διαθέτουν πλαίσια TATA, παρόλο που τα περισσότερα εξ αυτών φαίνεται πως είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) τα οποία μεταγράφονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ανά πάσα στιγμή. Αυτό, βέβαια, δεν μοιάζει να αποτελεί πρόβλημα για τα κύτταρα, διότι πολύ απλά χρησιμοποιούν άλλες πρωτεΐνες, αντί της TBP, οι οποίες επιτρέπουν στον TFIID να προσδεθεί και να ξεκινήσει την αλληλουχία των συμβάντων που κορυφώνονται με την προσέλκυση της RNA πολυμεράσης II. Το γιατί έχει εξελιχθεί τούτη η εναλλακτική μέθοδος έναρξης είναι ακόμη ένα ερώτημα υπό διερεύνηση. Ίσως να είναι πολύ πιο εύκολο να ξεκινήσει η μεταγραφή από έναν υποκινητή που δεν διαθέτει TATA – ενδεχόμενο που συνάδει με τη χρήση αυτού του συστήματος από συστατικά εκφραζόμενα γονίδια για τα οποία δεν χρειάζεται να δημιουργηθεί και να ελεγχθεί ένα σύνθετο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης κατά την ανάπτυξη.

Για τη μεταγραφή των περισσότερων άλλων γονιδίων, η εξειδίκευση των τριών RNA πολυμερασών εξαρτάται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, από την ικανότητά τους να διακρίνουν μεταξύ υποκινητών. Η RNA πολυμεράση I, επί παραδείγματι, αναγνωρίζει υποκινητές οι οποίοι αποτελούνται από δύο διακριτά στοιχεία αλληλουχίας: το ένα στοιχείο ορίζει την περιοχή του κεντρικού υποκινητή, ενώ το άλλο είναι ένα ρυθμιστικό στοιχείο τοποθετημένο σε καθορισμένη απόσταση από τον κεντρικό υποκινητή, πάντοτε ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Κρατήστε δε κατά νου ότι η παρουσία πολλαπλών στοιχείων μέσα σε έναν υποκινητή δεν παρατηρείται μόνον στα γονίδια rRNA που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση I· σε κάθε περίπτωση, πάντως, οι σχετικές θέσεις των επιμέρους στοιχείων κατά μήκος του DNA είναι εκείνες που καθορίζουν την εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με την πολυμεράση και διασφαλίζουν ότι μόνον το συγκεκριμένο ένζυμο θα μεταγράψει τα εν λόγω γονίδια. Η RNA πολυμεράση III, από την άλλη, αναζητά υποκινητές οι οποίοι είναι ενσωματωμένοι μέσα στις κωδικές αλληλουχίες γονιδίων. Η διάταξη αυτή είναι χαρακτηριστική για τα tRNA και τα δομικά RNA· εξασφαλίζει δε ότι η αλληλεπίδραση των υποκινητών με την πολυμεράση III είναι ειδική. Και, τέλος, οι υποκινητές οι οποίοι αναγνωρίζονται από την RNA πολυμεράση II τείνουν να είναι πιο σύνθετοι, γεγονός που πιθανότατα αντικατοπτρίζει την αναπτυξιακή και κυτταροεξαρτώμενη εξειδίκευσή τους.

2.4 ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι οι RNA πολυμεράσες δεν ξεκινούν τη μεταγραφή από μόνες τους· απαιτούν, εν ολίγοις, την ταυτόχρονη παρουσία στο γονίδιο πληθώρας άλλων πρωτεϊνών και παραγόντων, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η έναρξη της μεταγραφής θα γίνει σωστά. Τούτο συνεπάγεται ότι η απώλεια ακόμα και ενός μέλους αυτής της ομάδας πρωτεϊνών μπορεί να παρεμποδίσει την εν γένει διαδικασία. Σ' αυτό το στάδιο η μεταγραφή γίνεται πραγματικά περίπλοκη – όχι μόνον επειδή υπάρχουν χιλιάδες δυνητικοί μεταγραφικοί παράγοντες που μπορούν να προσδεθούν σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στις κωδικές αλληλουχίες ή/και στις αλληλουχίες του υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου, αλλά επειδή υπάρχουν και πολλές πρόσθετες πρωτεΐνες (όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες) που αποτελούν μέρος του προεναρκτήριου συμπλόκου. Εάν επιπλέον ληφθεί υπόψη και η δυνατότητα –στην πραγματικότητα, η πιθανότητα– ότι πολλά απ' αυτά τα στοιχεία του προεναρκτήριου συμπλόκου είναι σε θέση να προσδεθούν και να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την επιγενετική τροποποίηση του γονιδιώματος, γίνεται φανερό ότι η ακριβής περιγραφή των μηχανισμών μέσω των οποίων λειτουργεί η μεταγραφή συνιστά ένα εκτενές και ιδιαίτερα σύνθετο ζήτημα, το οποίο δύσκολα θα μπορούσε να αναλυθεί επαρκώς σε τούτη τη σχετικά συνοπτική ενότητα.

Για να γίνει, πάντως, αντιληπτός ο τεράστιος αντίκτυπος που έχει η μη βασιζόμενη στην αλληλουχία τροποποίηση στον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδιώματος, το σημαντικότερο που πρέπει να κατανοήσει κανείς είναι ότι το DNA δεν υφίσταται απομονωμένο μέσα στον πυρήνα του κυττάρου αλλά υπάρχει με τη μορφή **χρωματίνης**. Ο όρος «χρωματίνη» ουσιαστικά αναφέρεται στο DNA και σε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών, κύρια λειτουργία των οποίων είναι να πακετάρουν τον τεράστιο όγκο του DNA μέσα στον σχετικά μικρό όγκο που καταλαμβάνει ο πυρήνας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για εμάς παρουσιάζει το ότι οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμεύουν επίσης για τον έλεγχο της πρόσβασης της μεταγραφικής μηχανής στις πληροφορίες που είναι κωδικοποιημένες στο DNA – γι' αυτό και στο επόμενο κεφάλαιο θα μελετήσουμε αναλυτικά τη χρωματίνη.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

- Τα γονίδια μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: εκείνα που κωδικοποιούν ριβοσωματικό, μεταφορικό, μη κωδικό ή αγγελιοφόρο RNA. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.
- Η σύνθεση του RNA από καθεμία απ' αυτές τις κατηγορίες γονιδίων αναφέρεται ως μεταγραφή. Μια ομάδα ενζύμων, οι λεγόμενες RNA πολυμεράσες, πραγματοποιούν τα στάδια της σύνθεσης του RNA· δεν μπορούν εντούτοις να δράσουν μόνες τους: για την προσέλκυση των πολυμερασών στη σωστή θέση πάνω στο γονίδιο είναι απαραίτητες πολλές άλλες πρωτεΐνες. Το σύνολο των πρωτεϊνών μαζί με την RNA πολυμεράση διαμορφώνει το προεναρκτήριο σύμπλοκο.
- Τα γονίδια διαθέτουν μη κωδικές περιοχές οι οποίες περιέχουν τις πληροφορίες αλληλουχίας που απαιτούνται για να καθοδηγηθεί η συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου. Οι περισσότερες απ' αυτές τις αλληλουχίες εμπεριέχονται σε μια περιοχή, τον λεγόμενο υποκινητή, κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής. Υπάρχουν, όμως, και άλλες ρυθμιστικές αλληλουχίες σε πιο απομακρυσμένες θέσεις (κάποιες φορές αποκαλούνται ενισχυτές ή καταστολείς). Τόσο ο υποκινητής όσο και αυτές οι απομακρυσμένες περιοχές έχουν θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες.

ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ

Archambault J & Friesen JD (1993) Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol Rev* 57:703-724.

Aso T, Conaway JW & Conaway RC (1994) Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. *J Biol Chem* 269:26575-26583.

Asturias FJ (2004) RNA polymerase II structure, and organization of the preinitiation complex. *Curr Opin Struct Biol* 14:121-129 (doi:10.1016/j.sbi.2004.03.007).

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2002) Biochemistry, 5th ed. W.H. Freeman & Co Ltd.

Boeger H, Bushnell DA, Davis R et al. (2005) Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett* 579:899-903 (doi:10.1016/j.febslet.2004.11.027).

Carter R & Drouin G (2009) Structural differentiation of the three eukaryotic RNA polymerases. *Genomics* 94:388-396 (doi:10.1016/j.ygeno.2009.08.011).

Carter R & Drouin G (2010) The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA poly-

merase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Mol Biol Evol* 27:1035-1043 (doi:10.1093/molbev/msp316).

Chung WH, Craighead JL, Chang WH et al. (2003) RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell* 12:1003-1013 (doi:10.1016/S1097-2765(03)00387-3).

Flanagan PM, Kelleher RJ, Feaver WJ et al. (1990) Resolution of factors required for the initiation of transcription by yeast RNA polymerase II. *J Biol Chem* 265:11105-11107.

Ginsburg HS & Vogel HJ (eds) (1984) Transfer and expression of eukaryotic genes. Elsevier.

Hashem Y, des Georges A, Dhote V et al. (2013) Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29. *Cell* 153:1108-1119 (doi:10.1016/j.cell.2013.04.036).

Kornberg RD (2001) The eukaryotic gene transcription machinery. *Biol Chem* 382:1103-1107 (doi: 10.1515/BC.2001.140).

Kornberg RD (2007) The molecular basis of eukaryotic transcription. *Cell Death Differ* 14:1989-1997 (doi:10.1038/sj.cdd.4402251).

Kornberg RD (2007) The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12955-12961 (doi:10.1073/pnas.0704138104).

Krumm A, Meulia T & Groudine M (1993) Common mechanisms for the control of eukaryotic transcriptional elongation. *Bioessays* 15:659-665.

Li Y, Flanagan PM, Tschochner H & Kornberg RD (1994) RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263:805-807 (doi:10.1126/science.8303296).

Nielsen S, Yuzenkova Y & Zenkin N (2013) Mechanism of eukaryotic RNA polymerase III transcription termination. *Science* 340:1577-1580 (doi:10.1126/science.1237934).

Nogales E (2000) Recent structural insights into transcription preinitiation complexes. *J Cell Sci* 113:4391-4397.

Nonet M, Sweetser D & Young RA (1987) Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* 50:909-915 (doi:10.1016/0092-8674(87)90517-4).

Rhee HS & Pugh BF (2012) Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* 483:295-301 (doi:10.1038/nature10799).

Sayre MH & Kornberg RD (1993) Mechanism and regulation of yeast RNA polymerase II transcription. *Cell Mol Biol Res* 39:349-354.

Strachan T & Reid A (2010) Human molecular genetics, 4th ed. Garland Science.

Sweetser D, Nonet M & Young RA (1987) Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1192-1196.

Tang H, Sun X, Reinberg D & Ebright RH (1996) Protein-protein interactions in eukaryotic transcription initiation: structure of the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1119-1124.

Tsai FT & Sigler PB (2000) Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J* 19:25-36 (doi:10.1093/emboj/19.1.25).

3

ΤΟ ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ Η ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

3.1 Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ Η ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ

3.2 Η ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

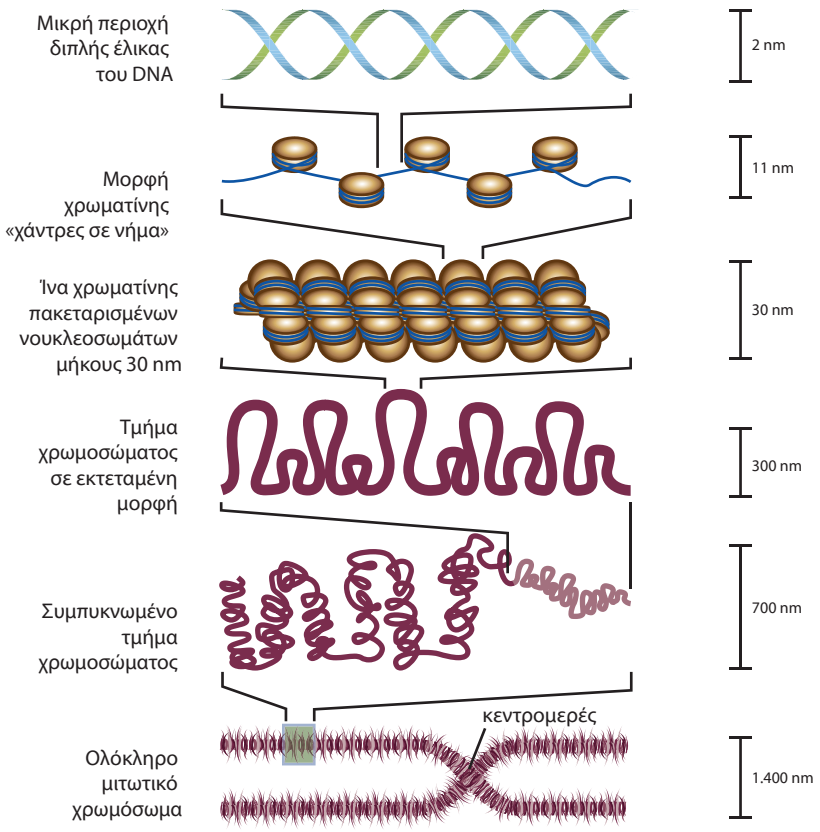
Πολλοί τύποι κυττάρων παρουσιάζουν αρκετά υψηλά επίπεδα μεταγραφικής δραστηριότητας, ιδίως όταν βρίσκονται σε διαδικασία ενεργής διαίρεσης ή αύξησης. Ακόμα, όμως, και τα κύτταρα που είναι μεταγραφικά λιγότερο ενεργά χρειάζεται να διατηρούν το σύνολο των γονιδίων τους, καθώς και άλλες μη κωδικές περιοχές του DNA, έστω και αν αυτές δεν χρησιμοποιούνται σε τακτική βάση. Αυτό μπορεί να αποτελεί πρόβλημα για τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, αφού συνεπάγεται ότι περιέχουν πολύ μεγάλη ποσότητα DNA σε σχέση με το μέγεθός τους: Για την πλειονότητα των ευκαρυωτικών πυρήνων ισχύει ότι, εάν τεντώναμε το μακρομόριο του DNA από τις δύο άκρες του, αυτό θα εκτεινόταν σε μήκος περίπου δύο μέτρων· άρα, το ότι χωράει μέσα σε έναν πυρήνα τάξης μεγέθους λίγων μικρομέτρων συνιστά ένα πραγματικά εντυπωσιακό επίτευγμα. Προκειμένου να χωρέσουν, λοιπόν, το DNA μέσα στα κύτταρά τους, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν μια κοινή βασική στρατηγική: το τυλίγουν σφιχτά σε «σφαίρες», τα λεγόμενα **νουκλεοσώματα** (φανταστείτε τα σαν χάντρες πάνω σε ένα νήμα), τα οποία, στη συνέχεια, σχηματίζουν δομές με πακετάρισμα υψηλότερου επιπέδου (φανταστείτε, δηλαδή, ότι το νήμα με τις χάντρες αναδιπλώνεται). Στην **Εικόνα 3.1** παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση όλης της διαδικασίας που ακολουθείται για το πακετάρισμα αυτό.

3.1 Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ Η ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ

Η χρωματίνη αποτελείται από DNA και πολλές πρωτεΐνες

Τα χρωμοσώματα έχουν έναν ιριδίζοντα χρωματισμό, γεγονός στο οποίο μάλλον οφείλεται και η ίδια η ονομασία τους. Η λέξη «χρωμόσωμα» αποτελεί, προφανώς, σύνθετο των λέξεων χρώμα και σώμα· έχει δε εδραιωθεί ως όρος, μια και είναι περισσότερο εύηχος από το «χρωματισμένο σώμα». Κατ' επέκταση, το υλικό των χρωμοσωμάτων περιγράφεται με τον όρο «**χρωματίνη**».

Παρότι η χημική φύση του DNA και η παρουσία του στα χρωμοσώματα ήταν γνωστή ήδη από τα μέσα του 20ού αιώνα, δεν υπήρχαν συγκεκριμένες πληροφορίες για τη λειτουργία της χρωματίνης, μέχρι που το 1953 οι Francis Crick και James Watson ανέδειξαν τη συνεισφορά των



Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων που ακολουθούνται για το πακετάρισμα του DNA. Κάθε μόριο DNA συγκροτείται σε ένα μιτωτικό χρωμόσωμα, το μήκος του οποίου είναι 50.000 φορές βραχύτερο από το αρχικό μήκος του μορίου σε πλήρη έκταση.

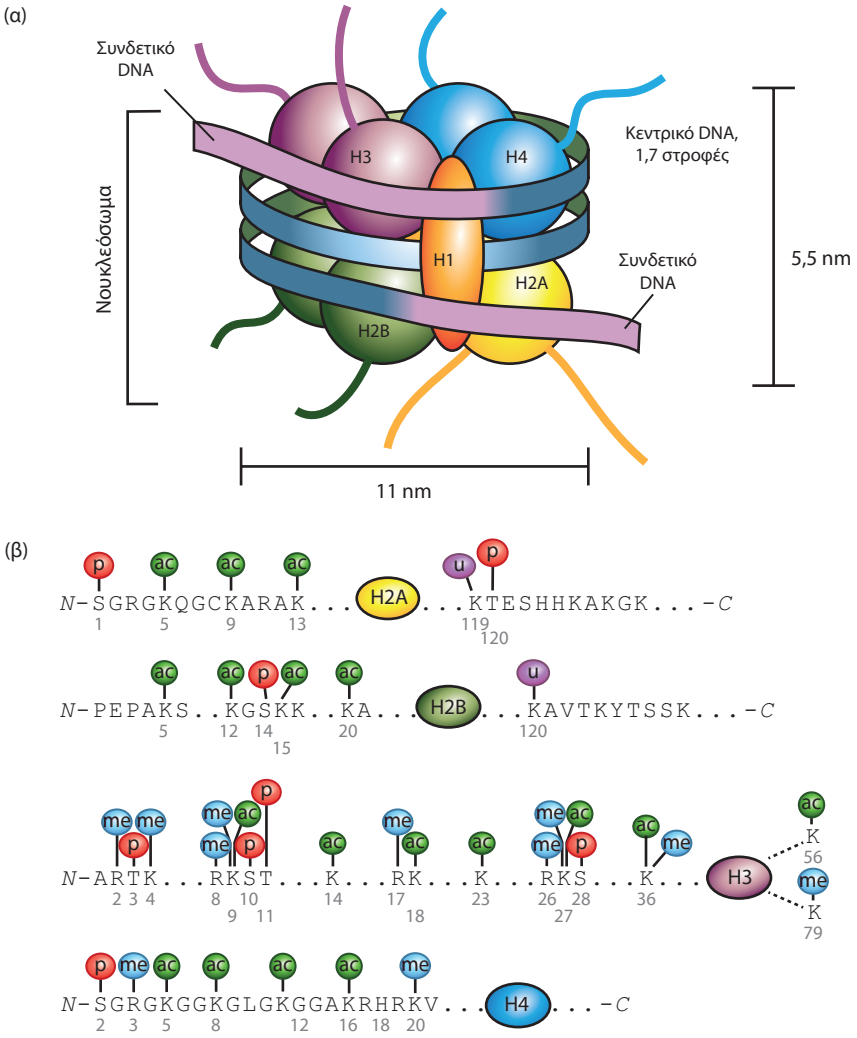
νουκλεϊκών οξέων στην κληρονομικότητα (η οποία μέχρι τότε ήταν αμφισβητούμενη). Την ίδια περίοδο κατέστη προφανές ότι στη δομή της χρωματίνης δεν υπάρχει μόνον DNA. Πράγματι, το μεγαλύτερο μέρος ενός χρωμοσώματος δεν απαρτίζεται από DNA, αλλά από μια πληθώρα πρωτεϊνών των οποίων η λειτουργία για πολλά χρόνια θεωρούνταν απλώς δομικής φύσης, ένα «στήριγμα» για το DNA μέσα στον πυρήνα. Σήμερα πλέον γνωρίζουμε ότι αυτό είναι εν μέρει σωστό: Οι πρωτεΐνες αποτελούν όντως τη βασική δομή των νουκλεοσωμάτων, υποστηρίζοντας πράγματι το DNA και παρουσιάζοντάς το στη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου. Εντούτοις, υπάρχουν και πολλές άλλες πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργία έχει να κάνει με τον έλεγχο του τρόπου με τον οποίο το κύτταρο αποκτά πρόσβαση στην πληροφορία που περιέχεται στο DNA. Ας σημειωθεί δε ότι αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται να επηρεάζουν σε κάποιον βαθμό τη δομή της χρωματίνης, εξ ου και είναι δύσκολο να διακρίνει κανείς τις επιμέρους λειτουργίες τους.

Το νουκλεόσωμα είναι η βασική μονάδα της χρωματίνης

Η θεμελιώδης μονάδα της χρωματίνης, το **κεντρικό νουκλεοσωματικό σωμάτιο** (nucleosome core particle, **NCP**), οργανώνει 147 ζεύγη βάσεων (base pair, bp) DNA σε 1,7 αριστερόστροφη υπερελικωμένη στροφή γύρω από ένα οκταμερές τεσσάρων κεντρικών ιστονών, των H2A, H2B, H3 και H4 (**Εικόνα 3.2**). Τα δε νουκλεοσώματα διασυνδέονται μέσω μικρών τμημάτων **συνδετικού DNA**, τα οποία αλληλεπιδρούν με τη **συνδετική ιστόνη H1**.

Οι δομές των επιμέρους ιστονών καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο συνδέονται για να σχηματίσουν το οκταμερές. Μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X έχει αποκαλυφθεί ότι το ιστονικό οκταμερές συνιστά μια τριμερή διευθέτηση στην οποία δύο διμερή (H2A-H2B) βρίσκονται εκατέρωθεν ενός κεντρικά τοποθετημένου τετραμερούς (H3-H4). Από τη σύγκριση της ακολουθίας αμινοξέων των ιστονών σε ευρύ φάσμα ειδών έχουν αναδειχθεί σημαντικές διαφορές, κάτι που αρχικά είχε οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι διάφορες ιστόνες δεν επιτελούν την ίδια λειτουργία. Παρ' όλα αυτά, όλες μοιράζονται ένα κοινό δομικό μοτίβο, γνωστό ως **πτυχή ιστόνης** (**Πλαίσιο 3.1**), το οποίο φαίνεται πως είναι απαραίτητο για τον διμερισμό των ιστονών κατά τον σχηματισμό του οκταμερούς.

Αυτό το δομικό στοιχείο έχει συντηρηθεί σε όλη την πορεία της εξέλιξης. Εμφανίστηκε για πρώτη φορά στα αρχαιοβακτήρια, στα οποία ο ρόλος του ήταν να βοηθά την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που δεν συ-



Εικόνα 3.2 Το κεντρικό νουκλεόσωμα και το οκταμερές των ιστονών.
(α) Η δομή του οκταμερούς ιστονών με τις N-τελικές ουρές σε πλήρη έκταση. (β) Οι θέσεις των ιστονικών αμινοξικών καταλοίπων στα οποία γίνονται οι τροποποιήσεις επισημαίνονται πάνω από τις αλληλουχίες. Οι διάφοροι τύποι μετατροπών περιλαμβάνουν ακετυλίωση (ac), μεθυλίωση (me), φωσφορυλίωση (p) και ουβικιτίνωση (u).

γκροτούνται σε νουκλεοσώματα με τον τρόπο που συμβαίνει στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αργότερα εμφανίστηκε και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι, μάλιστα, αξιοσημείωτο ότι, παρά τα εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης που έχουν μεσολαβήσει από τη στιγμή που αναδύθηκαν οι ευκαρυώτες, το μοτίβο πτυχής ιστόνης έχει αλλάξει ελάχιστα, γεγονός που υποδεικνύει την τεράστια σημασία του για τη λειτουργία του ευκαρυωτικού κυττάρου. Οι υπόλοιπες δομικές περιοχές των ιστονών πιθανότατα είναι αναγκαίες για την πρόσδεση στο DNA, διεργασία η οποία εξαρτάται από το εκάστοτε γονίδιο, τον κυτταρικό τύπο και το είδος οργανισμού – επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το ότι υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε τούτες τις περιοχές.

Το DNA προσδένεται στο οκταμερές των ιστονών

Η σπουδαιότητα του μοτίβου πτυχής ιστόνης δεν έγκειται μόνον στην ικανότητά του να καθοδηγεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών· συμβάλλει και στην ικανότητα του οκταμερούς να επάγει το τύλιγμα του DNA γύρω του. Περιοχές στις πτυχές των ιστονών παρουσιάζονται στην εξωτερική επιφάνεια του οκταμερούς και, επομένως, μπορούν να έρθουν σε επαφή με το DNA. Θυμηθείτε ότι το τμήμα του DNA σε κάθε κεντρικό νουκλεοσωματικό σωμάτιο αποτελείται από περίπου 147 bp. Από τις 14 διαθέσιμες μικρές αύλακες σε τούτο το τμήμα που κοιτάζουν προς το οκταμερές, οι 12 βρίσκονται σε επαφή μ' αυτές τις εκτεθειμένες περιοχές των ιστονών. Όλες δε οι αλληλεπιδράσεις των πτυχών ιστόνης γίνονται με την εσωτερική επιφάνεια του υπερελικωμένου DNA και καλύπτουν μια έκταση 121 bp, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.3**· εντούτοις, δεν είναι ακόμη σαφές σε ποιον ακριβώς βαθμό συνεισφέρουν στη συνολική σταθερότητα του συμπλόκου DNA-οκταμερούς, και τούτο διότι και άλλα δομικά στοιχεία των αμινοξικών ακολουθιών των ιστονών φαίνεται να εμπλέκονται στην πρόσδεση του DNA.

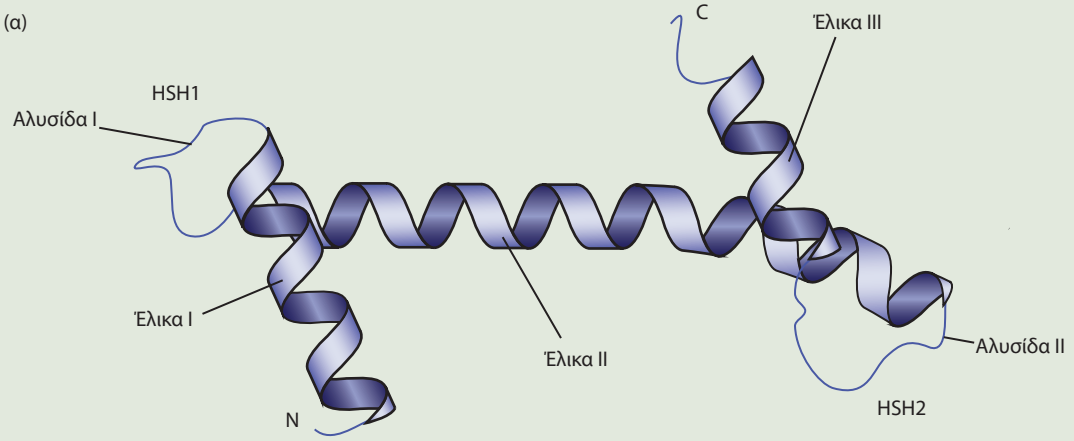
Σε κάθε περίπτωση, η αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης του DNA δεν είναι ίδια σε όλες τις θέσεις

Πλαίσιο 3.1 Η πτυχή ιστόνης

Και οι τέσσερις κεντρικές ιστόνες περιέχουν μια δομική επικράτεια γνωστή ως *πτυχή ιστόνης* (Εικόνα 1α), η οποία αποτελείται από μια μακριά κεντρική έλικα που στα δύο άκρα της διαμορφώνει δύο **μοτίβα έλικας-αλυσίδας-έλικας** (helix-strand-helix, **HSH**). Πιο αναλυτικά, η πτυχή ιστόνης αποτελείται από μια έλικα 11 καταλοίπων (έλικα I), η οποία ακολουθείται από μια μικρή θηλιά και μια αλυσίδα (αλυσίδα I), μια μακρύτερη (περίπου 27 καταλοίπων) έλικα (έλικα II), ακόμα μια μικρή θηλιά και μια αλυσίδα (αλυσίδα II), και μια τελική έλικα 11 καταλοίπων (έλικα III). Ο ακριβής αριθμός καταλοίπων σε κάθε τμήμα έλικας και θηλιάς ή αλυσίδας ποικίλλει, κατά ένα ή δύο αμινοξέα, μεταξύ των διαφορετικών ιστονών. Στην Εικόνα 1β δίνονται οι αλληλουχίες των περιοχών πτυχής των τεσσάρων κεντρικών ιστονών στα θηλαστικά. Συνήθως, τέτοιες πρωτεΐνες διμερίζονται για να σχηματίσουν τύπους δομών όπως αυτές που φαίνονται στην Εικόνα 1γ, στις οποίες η αλυσίδα από το N-τελικό μοτίβο HSH μίας πτυχής ζευγαρώνει με την C-τελική αλυσίδα μιας άλλης. Από το ζευγάρωμα των δύο πτυχών διαμορφώνεται μια κυρτή εξωτερική επιφάνεια που περιλαμβάνει τις τρεις περιοχές (γκρι) οι οποίες ακουμπούν στην εσωτερική επιφάνεια του νουκλεοσωματικού DNA (Εικόνα 1δ). Διμερή σχηματίζονται αρχικά μεταξύ των ιστονών H3 και H4· στη συνέχεια, δύο τέτοια διμερή διασυνδέονται ώστε να σχηματιστεί ένα τετραμερές $(H3\text{-}H4)_2$. Κατόπιν, οι ιστόνες H2A και H2B χρησιμοποιούν ειδικές βραχείες αλυσίδες αμινοξέων, γνωστές ως **αλληλουχίες αγκυροβόλησης**, για να προσδεθούν στο τετραμερές $(H3\text{-}H4)_2$ και να σχηματίσουν το ιστονικό οκταμερές που απαιτείται για τη διαμόρφωση του κεντρικού νουκλεοσωματικού σωματίου.

Εικόνα 1 Δομή, αλληλουχία και διμερισμός του μοτίβου πτυχής ιστόνης. (α) Η πτυχή ιστόνης. (β) Η αλληλουχία της περιοχής πτυχής των τεσσάρων κεντρικών ιστονών στα θηλαστικά. (γ) Διμερές ιστονών. (δ) Διμερές ιστονών που αγκυροβολεί σε νουκλεοσωματικό DNA. [Προσαρμοσμένη από Ramakrishnan V (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 83. Κατόπιν αδείας από Annual Reviews, Inc.]

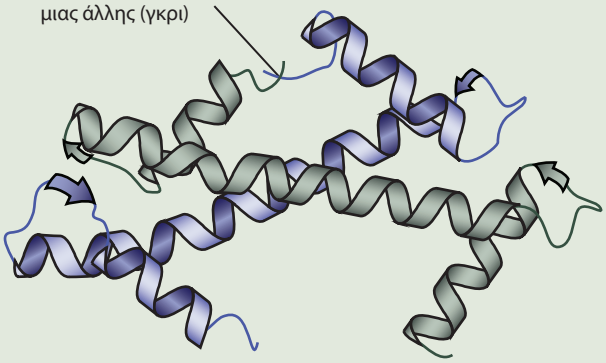
(α)



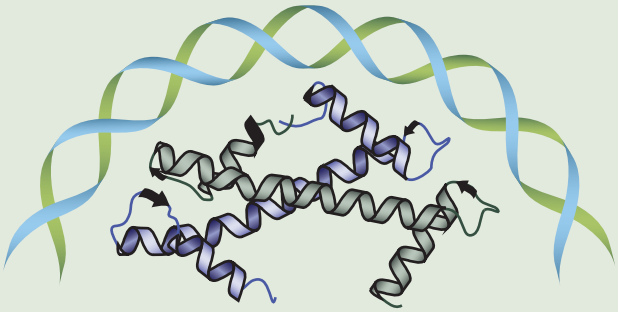
(β)

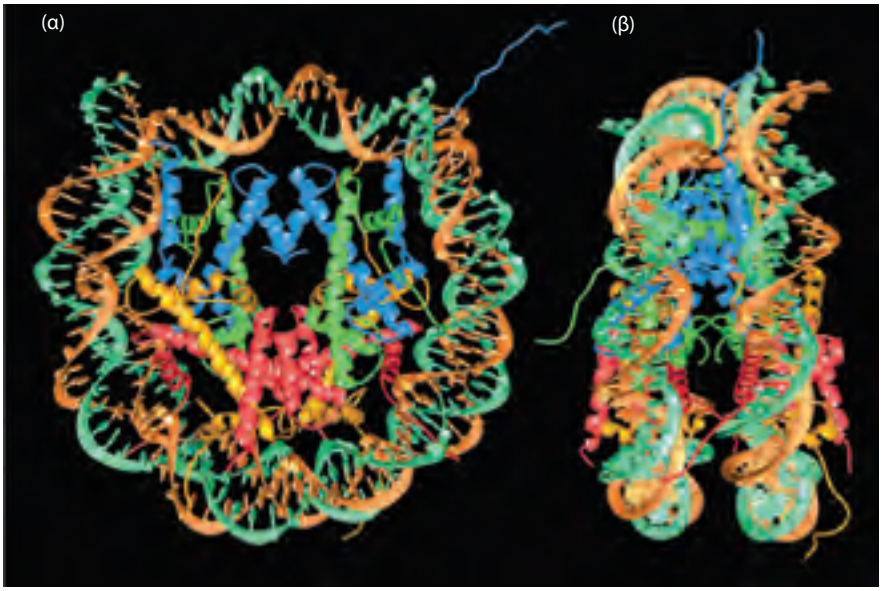
		Έλικα I	Θηλιά/ Αλυσίδα I	Έλικα II	Θηλιά/ Αλυσίδα II	Έλικα III	
H2A	(25)	PVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLAAVLEYLTAEILELAGNPARDNKKTRIIPRHLQLAIRND					(38)
H2B	(36)	YSIYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLL					(24)
H3	(66)	FQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQWASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIR					(4)
H4	(29)	TKPAIRRLARRGGV-KRISGLIYEETRGVLKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQ					(9)

(γ) Ζευγάρωμα του N-τελικού άκρου μιας πτυχής ιστόνης (ιώδες) με το C-τελικό άκρο μιας άλλης (γκρι)

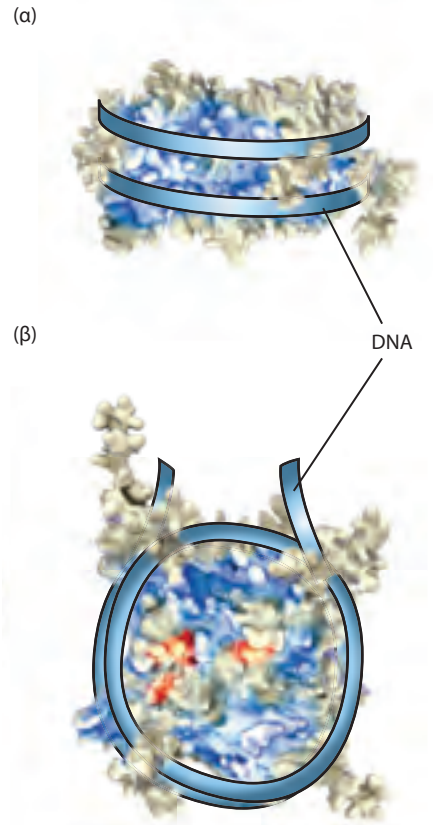


(δ)





Εικόνα 3.3 Η αλληλεπίδραση του DNA με ένα οκταμερές ιστονών. Στο (α) παρουσιάζεται η πρόσθια όψη του συμπλόκου, ενώ στο (β) παρουσιάζεται η πλευρική όψη. Εδώ απεικονίζεται η πρόσδεση του DNA στις πολυπεπτιδικές επιφάνειες που παρουσιάζονται από το ιστονικό οκταμερές για τον σχηματισμό του νουκλεοσώματος. Όπως φαίνεται, οι αμινοτελικές «ουρές» των επιμέρους ιστονών προεξέχουν από τη σφαιρική επιφάνεια του νουκλεοσώματος. [Από Luger K, Mäder AW, Richmond RK et al. (1997) *Nature* 389, 251. Κατόπιν αδείας από Macmillan Publishers Ltd.]



Εικόνα 3.4 Το ηλεκτροστατικό δυναμικό επιφανείας του κεντρικού νουκλεοσωματικού σωματίου. Το ηλεκτροστατικό δυναμικό του NCP κυμαίνεται από +20 (κυανό) μέχρι -20 (ερυθρό). (PDB, καταχώριση 1KX5.) (α) Πλευρική όψη του NCP. Τα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη είναι θετικά φορτισμένα, διότι περιέχουν πλευρικές αλυσίδες με αμινομάδες που είτε ιοντίζονται εύκολα (η γ-αμινομάδα της λυσίνης) είτε είναι ήδη φορτισμένες (η γουανιδική ομάδα της αργινίνης). Στις θετικά φορτισμένες περιοχές που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση του DNA αφθονούν τα συγκεκριμένα αμινοξέα. Προσέξτε την κατανομή των θετικών φορτίων (κυανό) γύρω από τη διεπαφή του DNA με τις ουρές των κεντρικών ιστονών (αν και οι ίδιες οι ουρές έχουν χαμηλότερη πυκνότητα φορτίου). (β) Κορυφαία όψη του NCP. Αυτή η επιφάνεια περιέχει αρκετά αρνητικά φορτία (ερυθρό) στην εκτεθειμένη έκταση του οκταμερούς ιστονών. [Προσαρμοσμένη από Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA & Landsman D (2005) *Expert Rev. Proteom.* 2, 719. Κατόπιν αδείας από Expert Reviews Ltd.]

που προαναφέρθηκαν· η ικανότητα των επιμέρους περιοχών των ιστονικών μορίων να δεσμεύουν το DNA φαίνεται πως εξαρτάται εν πολλοίς από το ηλεκτροστατικό δυναμικό της επιφάνειας του NCP. Υπολογισμοί αυτού του δυναμικού αποκαλύπτουν θετικά φορτισμένες περιοχές στα αμινοτελικά άκρα-ουρές των ιστονών, καθώς και στο κεντρικό νουκλεόσωμα, όπου το DNA δημιουργεί μη ειδικές επαφές με την επιφάνεια των πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.4**). Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ DNA και νουκλεοσώματος μπορεί να εξηγηθεί από την ελικοειδή φύση του μακρομορίου του DNA, η οποία διασφαλίζει ότι ο σκελετός των φωσφορικών ομάδων με το εγγενές αρνητικό τους φορτίο παρουσιάζεται στις αμινομάδες (κυανές περιοχές στην Εικόνα 3.4) της κύριας αλυσίδας των ιστονών. Αντιθέτως, οι περισσότερο αρνητικές περιοχές των ιστονών βρίσκονται κοντά στο κέντρο του νουκλεοσώματος και, φυσιολογικά, δεν έρχονται σε επαφή με το DNA.

Η αλληλεπίδραση του DNA μ' αυτές τις θέσεις πρέπει να είναι πολύ ισχυρή, αφού προϋποθέτει σημαντική παραμόρφωση του μακρομορίου του DNA. Επομένως, η περιέλιξη του DNA γύρω από το νουκλεόσωμα αποτελεί σημαντική ενεργειακή επένδυση, η οποία μερικώς μόνον αντισταθμίζεται με την εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων του φωσφοδιεστερικού σκελετού από τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Ο αριθμός και η φύση τούτων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ νουκλεϊκού οξέος και ιστονών, αλλά και το γεγονός ότι σ' αυτές εμπλέκονται κυρίως τα τμήματα του DNA με μη ειδικές αλληλουχίες (δηλαδή ο φωσφοδιεστερικός σκελετός), υπονοούν ότι νουκλεοσώματα μπορούν να σχηματιστούν από οποιαδήποτε αλληλουχία DNA. Αυτό, βέβαια, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες.

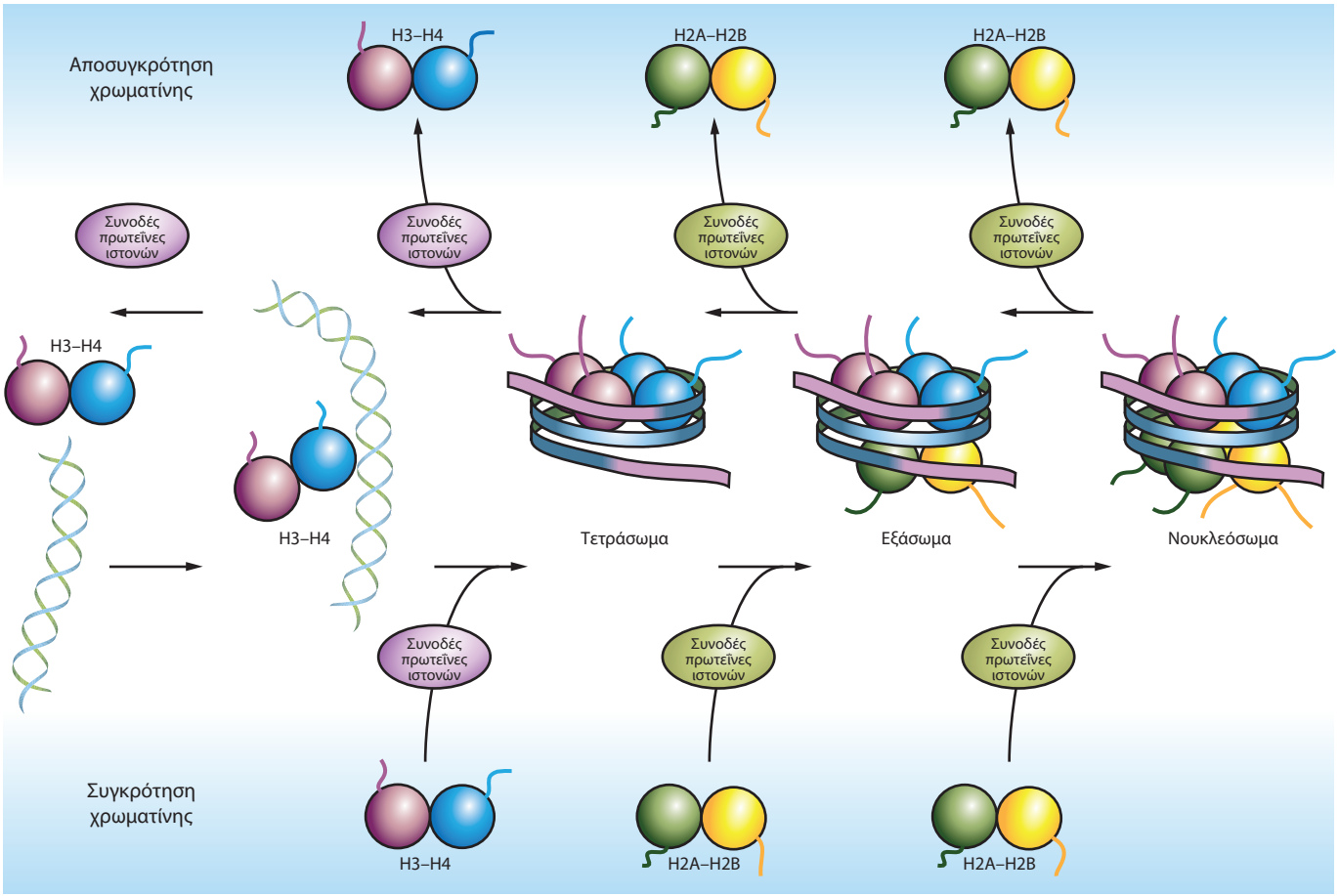
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΕΣ ΣΥΝΟΔΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΙΣΤΟΝΩΝ

Συνοδός πρωτεΐνη	Οικογένεια και ομόλογα	Ιστόνη	Σχετιζόμενη λειτουργία
Πυρηνοπλασμίνη	NPM1/νουματρίνη/νουκλεοφωσμίνη NPM2 NPM3 NLP	H2A/H2B	Αποθήκευση H2A/H2B στα ωοκύτταρα Αποσυμπύκνωση χρωματίνης σπέρματος Βιογένεση ριβοσωμάτων Συμπύκνωση αποπτωτικής χρωματίνης
NAP1	NAP1/NAP1L–NAP1L4	H2A/H2B	Ανταλλαγή παραλλαγής ιστόνης H2A Εναπόθεση συνδετικής ιστόνης Μετακίνηση ιστονών
N1/N2	NASP, N1/N2, Hif1	H3/H4	Αποθήκευση «δεξαμενής» H3/H4 στα ωοκύτταρα Εναπόθεση συνδετικής ιστόνης Μεταφορά συνδετικής ιστόνης
CAF1	P150, p180, cac1, p60		Αποσιώπηση τελομερών Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου

Μέχρι στιγμής δεν είναι σαφές εάν η αλληλουχία του DNA μπορεί να επηρεάσει την ακριβή θέση στην οποία θα σχηματιστεί ένα νουκλεόσωμα. Υπάρχουν, όμως, αρκετά ενδεχόμενα: Μπορεί, λόγου χάρη, κάποιες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες να «αντιστέκονται» στην απαιτούμενη στερεοχημική παραμόρφωση περισσότερο από άλλες. Εάν ισχύει κάτι τέτοιο, αυτό συνεπάγεται ότι το ιστονικό οκταμερές δεν μπορεί να σχηματίσει ένα νουκλεόσωμα σε τούτες τις θέσεις και έτσι εξαναγκάζεται να «μετακινηθεί» ελαφρώς προς μια περιοχή όπου θα μπορέσει ευκολότερα να κάμψει το DNA όπως απαιτείται. Σε κάθε περίπτωση, η τοποθέτηση του οκταμερούς ανάλογα με την προτίμησή του σε αλληλουχίες DNA θα εξαρτηθεί από το άθροισμα του ενεργειακού κόστους που προκύπτει από τη δομική προσαρμογή του DNA σε καθεμιά από τις 12 σημαντικές θέσεις πρόσδεσης. Βέβαια, είναι επίσης πιθανό ότι στον επιμέρους συντονισμό της τοποθέτησης των νουκλεοσωμάτων εμπλέκονται και άλλες, σχετικά ήσσονος σημασίας, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών και του DNA (ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στο ιστονικό οκταμερές υπάρχουν 146 θέσεις με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου). Αυτό, μάλιστα, πιθανώς αποτελεί ένα από τα γνωρίσματα που εντέλει διαμορφώνουν την ποικιλότητα στο μήκος των αλληλουχιών του συνδετικού DNA.

Σε *in vitro* πειράματα στα οποία απλώς αναμειγνύονται ιστόνες με DNA, η συνένωση των ιστονών μέσω των μοτίβων πτυχής, τόσο για τον σχηματισμό του οκταμερούς όσο και για τη δημιουργία του συνολικού νουκλεοσώματος, συμβαίνει αυθόρμητα. Εντούτοις, σύντομα μετά την πρώτη περιγραφή του νουκλεοσώματος ως βασικής μονάδας της χρωματίνης, μια σειρά *in vitro* πειραμάτων έδειξαν ότι η προσθήκη εκχυλίσματος από ωάρια *Xenopus laevis* στο μείγμα ιστονών-DNA επιταχύνει τη διαδικασία σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων. Αυτό υποδήλωσε ότι στο εκχύλισμα των ωαρίων υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες οι οποίοι ενισχύουν τον σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων, και τελικά οδήγησε στην απομόνωση της πρώτης **συνοδής πρωτεΐνης (σαπερόνης) των ιστονών**, της πυρηνοπλασμίνης (ή νουκλεοπλασμίνης). Οι συνοδές πρωτεΐνες των ιστονών είναι μια ομάδα όξινων πρωτεϊνών που προσδένονται σε ιστόνες και συμβάλλουν στη συγκρότηση και την αποσυγκρότηση της χρωματίνης κατά τη μεταγραφή και την αντιγραφή του DNA. Έχει ανακαλυφθεί μεγάλος αριθμός συνοδών πρωτεϊνών των ιστονών, τέσσερις εκ των οποίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**. Κατά τη συγκρότηση της χρωματίνης, αρχικά μια συνοδός πρωτεΐνη κεντρικών ιστονών, η NAP1 (nucleosome assembly protein 1), μεταφέρει σταδιακά τις κεντρικές ιστόνες, και ακολούθως ο παράγοντας ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) προάγει την ωρίμαση της χρωματίνης (**Εικόνα 3.5**). Τούτα τα καθορισμένα πολλαπλά βήματα μπορούν να γίνουν σταδιακά ή να οδηγήσουν κατευθείαν στον σχηματισμό μιας σειράς νουκλεοσωμάτων.

Οι περισσότερες συνοδές πρωτεΐνες εμφανίζουν μια προτίμηση πρόσδεσης είτε για τα διμερή H3-H4 είτε για τα διμερή H2A-H2B. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να διαλευκανθεί ο μηχανισμός με τον οποίο οι συνοδές πρωτεΐνες των ιστονών προάγουν τη συγκρότηση των νουκλεοσωμάτων, ωστόσο δεν υπάρχει ακόμη μια ενιαία άποψη περί του ζητήματος. Σε κάθε περίπτωση, πάντως, το ενδιαφέρον σήμερα επικεντρώνεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να αναστέλλουν τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ



Εικόνα 3.5 Μοντέλα για τη συγκρότηση και την αποσυγκρότηση των νουκλεοσωμάτων. [Προσαρμοσμένη από Das C, Tyler JK & Churchill ME (2010) *Trends Biochem. Sci.* 35, 476. Κατόπιν αδείας από Elsevier.]

DNA και ιστονών, έτσι ώστε το ηλεκτροστατικό δυναμικό των κατάλληλων περιοχών στην επιφάνεια του οκταμερούς να επάγει την πρόσδεση του DNA.

3.2 Η ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

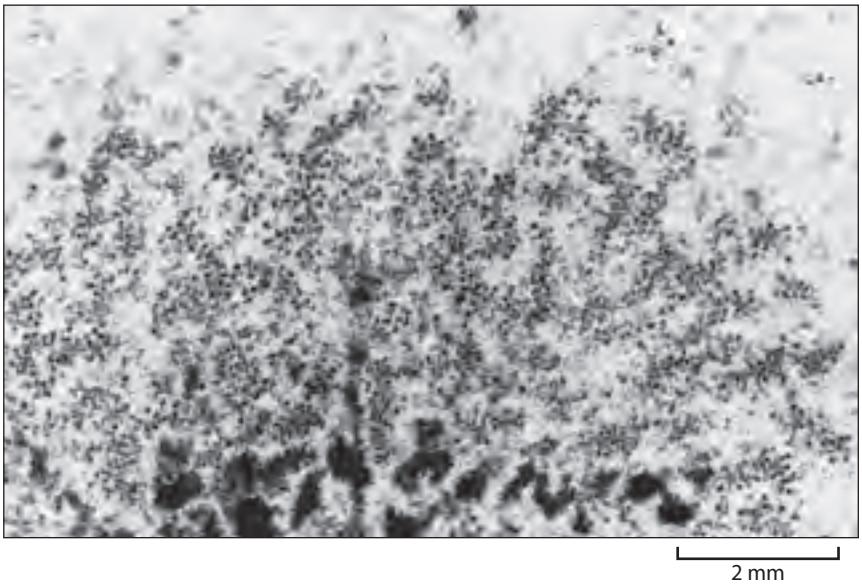
Σειρές νουκλεοσωμάτων οργανώνονται σε ίνες χρωματίνης

Αν και η δομή του πρώτου επιπέδου αναδίπλωσης του DNA, του κεντρικού νουκλεοσώματος, έχει προσδιοριστεί σε επίπεδο ατόμου, η δομή του δεύτερου επιπέδου αναδίπλωσης, όπου μια σειρά νουκλεοσωμάτων αναδιπλώνεται σε μια ίνα με διάμετρο περίπου 30 nm, παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη. Πρώιμες ενδείξεις για την *in vivo* ύπαρξη μιας **χρωματινικής ίνας 30 nm**[1] προέκυψαν από αναλύσεις ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας των χρωμοσωματικών περιοχών που βρίσκονται στους δακτύλιους Balbiani[2] στις μύγες *Chironomus tentans* (**Εικόνα 3.6**), καθώς και από μελέτες διάθλασης ακτίνων X σε κυτταρικούς πυρήνες. Τα ευρήματα τέτοιων αναλύσεων αποκάλυψαν ότι μεταξύ δύο νουκλεοσωμάτων υφίστανται αποστάσεις 30-40 nm.

Πρόσφατες δομικές αναλύσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν *in vitro ανασυσταθείσες* ίνες χρωματίνης *οδήγησαν στην πρόταση δύο μοντέλων* τα οποία διαφέρουν ως προς την τοπολογία, τις διαστάσεις και την πυκνότητα του πακεταρίσματος των νουκλεοσωμάτων (**Εικόνα 3.7**). Το πρώτο μοντέλο βασίστηκε σε μετρήσεις των φυσικών διαστάσεων μακριών γραμμικών σειρών νουκλεοσωμάτων, όπως φάνηκαν στο ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο, και αναφέρεται ως **έλικα μίας έναρξης** (one-start helix). Το μοντέλο αυτό περιγράφει την ίνα των 30 nm στην οποία υπάρχουν διαδοχικά νουκλεοσώματα, το ένα δίπλα στο άλλο. Έχει

[1] Σ.τ.Ε.: Εφεξής, με τον όρο «χρωματινική ίνα 30 nm» εννοείται «χρωματινική ίνα διαμέτρου 30 nm», εκτός και αν επισημαίνεται κάτι διαφορετικό.

[2] Σ.τ.Ε.: Οι δακτύλιοι Balbiani είναι πολύ μεγάλες «διογκώσεις» που εντοπίζονται σε κάποιες θέσεις στα πολυταινικά χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων των Δίπτερων. Δημιουργούνται όταν στις εν λόγω θέσεις γίνεται ενεργή μεταγραφή.



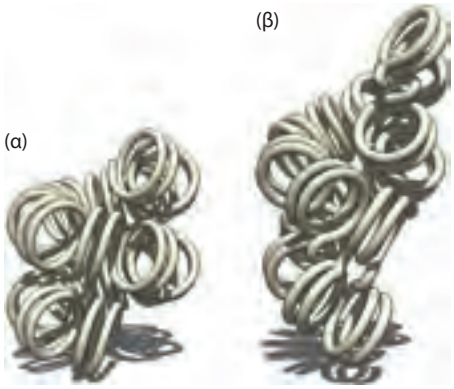
Εικόνα 3.6 Ηλεκτρονιομικρογράφημα των χρωμοσωματικών περιοχών που υπάρχουν στους δακτύλιους Balbiani της *Chironomus tentans*. [Από Skoglund U, Andersson K, Björkroth B et al. (1983) *Cell* 34, 847. Κατόπιν αδείας από Elsevier.]

διάμετρο 34 nm και η πυκνότητα πακεταρίσματος είναι 11 νουκλεοσώματα ανά 11 nm. Το δεύτερο μοντέλο είναι γνωστό ως **έλικα δύο ενάρξεων** (two-start helix) και βασίζεται σε μια διάταξη νουκλεοσωμάτων σε ζιγκ ζαγκ, το ένα πάνω στο άλλο, από την οποία προκύπτει μια ίνα διαμέτρου 24-25 nm, με πυκνότητα πακεταρίσματος πέντε ή εξι νουκλεοσωμάτων ανά 11 nm. Οι διαμορφώσεις που προτείνουν αυτά τα δύο μοντέλα συνεπάγονται ότι για τη μεν διασύνδεση των νουκλεοσωμάτων στην έλικα δύο ενάρξεων χρειάζονται ευθέα τμήματα συνδετικού DNA (οι αλληλουχίες DNA μεταξύ των νουκλεοσωμάτων), για τη δε περίπτωση της έλικας μίας έναρξης χρειάζεται κεκαμένο συνδετικό DNA.

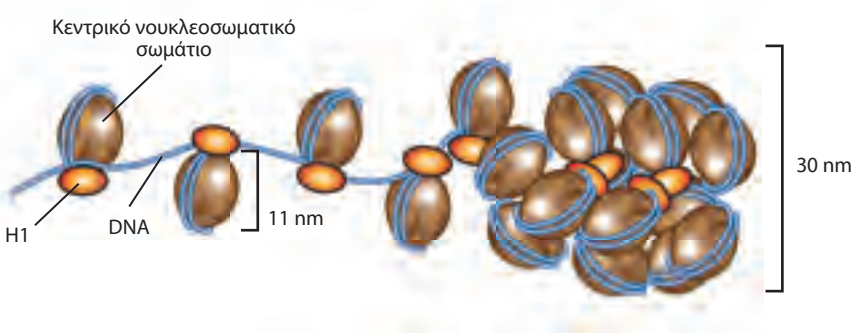
Τα μοντέλα αυτά παρουσιάζουν διάφορα προβλήματα. Ένα οφείλεται στο ότι τα δύο μοντέλα προέκυψαν ύστερα από ανάλυση διαφορετικών μορφών χρωματίνης: το πρώτο προέκυψε από την ανάλυση σειρών νουκλεοσωμάτων κορεσμένων με συνδετική ιστόνη, ενώ το δεύτερο προέκυψε από την ανάλυση μιας σειράς κεντρικού τετρανουκλεοσώματος απουσία συνδετικής ιστόνης. Η συνδετική ιστόνη H1 δεν αποτελεί μέρος του κεντρικού νουκλεοσώματος, αλλά μοιάζει να δρα ως «σφιγκτήρας» (σαν συνδετήρας) που βοηθά στη σταθεροποίηση της διασύνδεσης του DNA με το οκταμερές των ιστονών (**Εικόνα 3.8**).

Ορισμένες μελέτες έχουν προτείνει ότι η συνδετική ιστόνη δεν είναι απαραίτητη για τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Όμως, έχει βρεθεί ότι η γονιδιακή απενεργοποίηση (knockout) τριών από τις έξι γονιδιακές παραλλαγές του γονιδίου *H1* του ποντικιού προκαλεί θνησιμότητα σε εμβρυϊκό στάδιο, αλλά και ότι ακόμα και η απενεργοποίηση μεμονωμένων γονιδιακών παραλλαγών του *H1* μεταβάλλει την έκφραση άλλων γονιδίων και επηρεάζει τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Επιπλέον, *in vivo* πειράματα δείχνουν ότι παραλλαγές της συνδετικής ιστόνης ρυθμίζουν τη δυναμική της χρωματίνης κατά την πρώιμη εμβρυογένεση. Επομένως, φαίνεται πιθανό ότι οι συνδετικές ιστόνες επιτελούν κάποιον σημαντικό ρόλο.

Ένα άλλο δυνητικά σημαντικό πρόβλημα που παρουσιάζουν αυτά τα μοντέλα συμπύκνωσης είναι ότι διατυπώθηκαν βασιζόμενα στην υπόθεση ότι το μήκος του συνδετικού DNA μεταξύ των νουκλεοσωμά-



Εικόνα 3.7 Δύο προτεινόμενα μοντέλα για τη δομή της χρωματινικής ίνας 30 nm. (α) Η έλικα μίας έναρξης. (β) Η ζιγκ ζαγκ διευθέτηση των νουκλεοσωμάτων που αναφέρεται ως έλικα δύο ενάρξεων. Προσέξτε ότι, για λόγους απλούστευσης, τα οκταμερή ιστονών δεν έχουν συμπεριληφθεί στην εικόνα – φαίνονται μόνον οι θηλιές του DNA. [Ευγενική παραχώρηση, Richard Wheeler.]



Εικόνα 3.8 Σταθεροποίηση νουκλεοσωμάτων από τη συνδετική ιστόνη H1. Το κεντρικό νουκλεόσωμα επισημαίνεται με καφέ χρώμα, η ιστόνη H1 με πορτοκαλί και το DNA με κυανό. Σε τούτη τη σχηματική αναπαράσταση, τα νουκλεοσώματα είναι διατεταγμένα σύμφωνα με το μοντέλο της έλικας δύο ενάρξεων.

των είναι ίδιο. Η φύση, όμως, μοιάζει να μην ακολουθεί τούτο τον κανόνα: Το συνδετικό DNA μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων ποικίλλει σε μήκος (από 0 μέχρι 80 bp) ανάλογα με τον ιστό και το είδος του εκάστοτε οργανισμού. Η δε προσθήκη συνδετικής ιστόνης στη διαδικασία συμπύκνωσης όχι μόνον δεσμεύει (και άρα καθιστά μη προσβάσιμες) άλλα 20 bp του DNA, αλλά καθορίζει και την «πορεία» που θα ακολουθήσει το DNA για να εισέλθει και να εξέλθει από το νουκλεόσωμα – γεγονός που, με τη σειρά του, κατευθύνει τη σχετική τοποθέτηση των διαδοχικών νουκλεοσωμάτων. Απ' αυτά τα δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι κανένα από τα δύο μοντέλα δεν εξηγεί τη δομή της (περίπου) 30 nm χρωματινικής ίνας σε όλες τις περιπτώσεις. Κατά πάσα πιθανότητα, η δομή αυτή διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο στον οποίο συμβαίνει η συμπύκνωση.

Από τα παραπάνω φαίνεται πως ο τρόπος συμπύκνωσης εξαρτάται τόσο από το μήκος του επαναλαμβανόμενου νουκλεοσώματος όσο και από τη συνδετική ιστόνη. Μόνο μία νουκλεοσωματική επανάληψη μήκους 197 bp (147 bp DNA γύρω από το ιστονικό οκταμερές συν 50 bp συνδετικού DNA) μπορεί να σχηματίσει τη δομή χρωματίνης των 30 nm· ακόμα και αυτή, όμως, μπορεί να το κάνει μόνον με τη βοήθεια μιας συνδετικής ιστόνης. Άλλα μήκη νουκλεοσωματικής επανάληψης παρουσιάζουν περιορισμένη συμπύκνωση εξαρτώμενη από τη συνδετική ιστόνη· δημιουργούν δε λεπτότερες και τοπολογικά διαφορετικές ίνες. Στη φύση απαντούν διαφόρων μηκών νουκλεοσωματικές επαναλήψεις, οι οποίες, όμως, έχουν πολύ διαφορετική συχνότητα εμφάνισης: Εκείνες που αποτελούνται από 188 bp και 196 bp είναι μακράν οι συνηθέστερες, ενώ οι βραχύτερες, όπως οι επαναλήψεις των 165 bp που απαντούν στον *Saccharomyces cerevisiae*, είναι σχετικά πιο σπάνιες. Προς το παρόν δεν κατανοούμε την αιτία τούτων των διαφορών στο μήκος του DNA στη φύση. Αλλά και το τι συμβαίνει στις ίνες στο επόμενο στάδιο συμπύκνωσης είναι εξίσου ασαφές. Το μόνο μέχρι στιγμής ξεκάθαρο είναι ότι για την περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης απαιτείται ένα πρόσθετο βήμα, αφού ακόμα και το στάδιο της ίνας 30 nm δεν επαρκεί για να πακεταριστεί όλο το DNA που υπάρχει στον πυρήνα ενός κυττάρου.

Οι ίνες χρωματίνης οργανώνονται περαιτέρω σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη

Όποιος και αν είναι ο μηχανισμός πακεταρίσματος του DNA μέσα στον πυρήνα, θα πρέπει να διαμορφώνει διαφορετικούς τύπους συμπύκνωσης της χρωματίνης σε διαφορετικές περιοχές των χρωμοσωμάτων· και τούτο διότι αποτέλεσμα της ποικιλότητας στο πακετάρισμα είναι, μεταξύ άλλων, και η διαφοροποίηση των περιοχών που είναι μεταγραφικά ενεργές από εκείνες που είναι μεταγραφικά σιωπηλές. Καθώς τα κύτταρα ολοκληρώνουν τη μίτωση, μεγάλες περιοχές όλων των χρωμοσωμάτων τους αποσυμπυκνώνονται και έτσι «απλώνονται» σε μεγαλύτερη έκταση στους πυρήνες των δύο θυγατρικών κυττάρων. Αυτές οι περιοχές γίνονται ορατές ύστερα από χρώση με Giemsa ή κινακρίνη, δύο χρωστικές που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία «ζώνωσης» (banding) ή για την καρυοτύπηση των χρωμοσωμάτων. Η Giemsa είναι ειδική για τις φωσφορικές ομάδες του DNA, ενώ η κινακρίνη προσδένεται σε περιοχές που είναι πλούσιες σε αδενίνη/θυμίνη. Κάθε χρωμόσωμα έχει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ζώνωσης· σε γενικές γραμμές, όμως, οι έντονα χρωματισμένες περιοχές είναι εκείνες που συνήθως διπλασιάζονται σε πιο όψιμο στάδιο του κυτταρικού κύκλου και έχουν υψηλό ποσοστό AT, ενώ οι πιο ελαφρά χρωματισμένες είναι εκείνες που συνήθως διπλασιάζονται σε πρώιμο στάδιο και έχουν υψηλό ποσοστό GC. Το υλικό στις ελαφρά χρωματισμένες περιοχές αναφέρεται ως **ευχρωματίνη** και περιλαμβάνει τα περισσότερα ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια. Αντιθέτως, κάποιες χρωμοσωματικές περιοχές –ενίοτε δε και ολόκληρα χρωμοσώματα– που παραμένουν συμπυκνωμένες καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, συνιστούν τη λεγόμενη **ετεροχρωματίνη**, η οποία περιλαμβάνει κυρίως τμήματα γύρω από

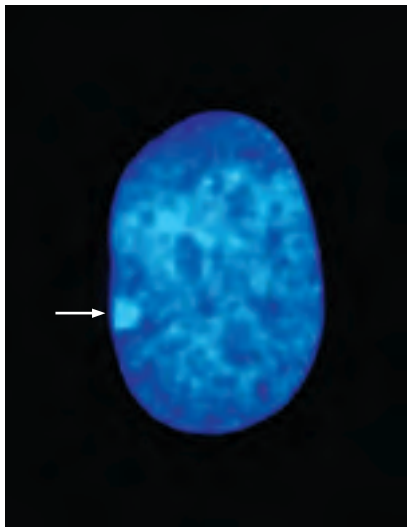
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΕΥΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΗΣ ΕΤΕΡΟΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΑ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ

Χαρακτηριστικό	Ευχρωματίνη	Ετεροχρωματίνη
Μορφή κατά τη μεσόφαση	Αποσυμπυκνωμένη (ελαφρύς χρωματισμός)	Συμπυκνωμένη (έντονος χρωματισμός, πυκνωτική)
Χρωμοσωματικός εντοπισμός	Απομακρυσμένα (άπω) άκρα	Γύρω από κεντρομερή, τελομερή
Χρονική περίοδος διπλασιασμού	Σε όλη τη διάρκεια της φάσης S	Σε όψιμο στάδιο της φάσης S
Σύσταση αλληλουχίας	Μοναδικό DNA, διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μέσου μήκους	Επαναλαμβανόμενο (δορυφορικό) DNA, μεγάλες περιοχές επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μέσου μήκους
Πυκνότητα γονιδίων	Κυμαινόμενη	Χαμηλή
Πυρηνικός εντοπισμός	Διάσπαρτος	Συχνά συγκεντρωμένος (στην πυρηνική περιφέρεια, γύρω από τους πυρηνίσκους)
Μειωτικός ανασυνδυασμός	Εκτεταμένος	Μη ανιχνεύσιμος
Μεθυλίωση DNA (σπονδυλωτά και φυτά)	Υπομεθυλιωμένα νησίδια CpG κοντά σε μεταγραφόμενα γονίδια	Εκτενής
Ακετυλίωση ιστονών	Υψηλή	Χαμηλή
Απόσταση νουκλεοσωμάτων	Ακανόνιστη	Τακτική
Προσβασιμότητα νουκλεασών	Κυμαινόμενη	Χαμηλή

τα κεντρομερή και τα τελομερή. Στον Πίνακα 3.2 παρατίθενται τα διαφορετικά χαρακτηριστικά της ευχρωματίνης και της ετεροχρωματίνης που είναι τυπικά των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων.

Οι θέσεις και οι πυκνότητες των περιοχών ετεροχρωματίνης δεν είναι σταθερές. Ορισμένες φαίνεται πως είναι ετεροχρωματινικές σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησης· τούτες οι περιοχές θεωρείται ότι αποτελούν τη λεγόμενη **συστατική ετεροχρωματίνη** και περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες που κατά κανόνα περιβάλλουν τα κεντρομερή και τα τελομερή, καθώς και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες όπως το δορυφορικό DNA. Άλλες χρωμοσωματικές περιοχές, όμως, είναι ετεροχρωματινικές σε κάποια κύτταρα και ευχρωματινικές σε άλλα· αυτές συνιστούν τη λεγόμενη **προαιρετική (δυνητική) ετεροχρωματίνη**, χαρακτηριστικό παράδειγμα της οποίας αποτελεί το σωμάτιο Barr στα θηλαστικά.

Το **σωμάτιο Barr** παρέχει ένα ιδιαίτερα εντυπωσιακό παράδειγμα γονιδιακής αποσιώπησης που βασίζεται στην ετεροχρωματίνη. Τούτη η πυρηνική δομή (Εικόνα 3.9) εντοπίζεται αποκλειστικά στα κύτταρα των θηλυκών θηλαστικών και αντιπροσωπεύει ένα μεταγραφικά απενεργοποιημένο χρωμόσωμα X. (Μ' αυτή την καθολική απενεργοποίηση τα θηλαστικά αντισταθμίζουν τον άνισο αριθμό των χρωμοσωμάτων X σε αρσενικά και θηλυκά άτομα.) Η ετεροχρωματινοποίηση, δηλαδή η μετατροπή της μεταγραφικά ενεργής ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη, του σωματίου Barr αρχίζει σε συγκεκριμένες θέσεις στο χρωμόσωμα



Εικόνα 3.9 Το σωμάτιο Barr. Η πυκνή δομή (λευκό βέλος) που εντοπίζεται εσωτερικά του πυρηνικού φακέλου στα κύτταρα των θηλυκών θηλαστικών αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετικά συμπυκνωμένο, απενεργοποιημένο χρωμόσωμα X. [Από Chadwick BP & Willard HF (2003) *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 359. Κατόπιν αδείας από Elsevier.]