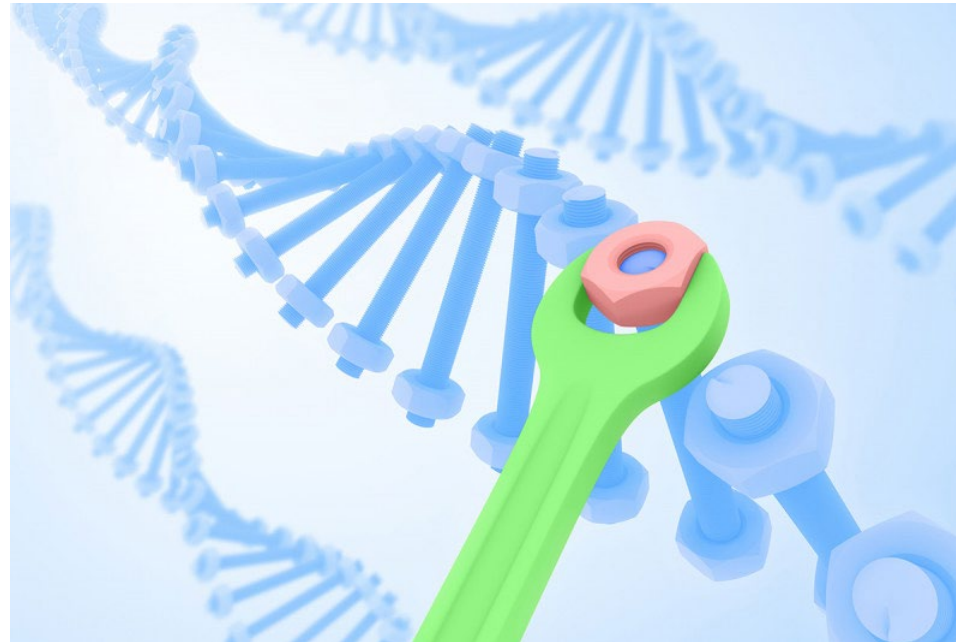


Διδασκαλία μικρών ομάδων Δεκέμβρης 2022



Βασίλης Ρούκος  
Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας  
Τμήμα Ιατρικής  
Πανεπιστήμιο Πατρών

# Τυπογραφικό Λάθος: Η αντιγραφική μηχανή

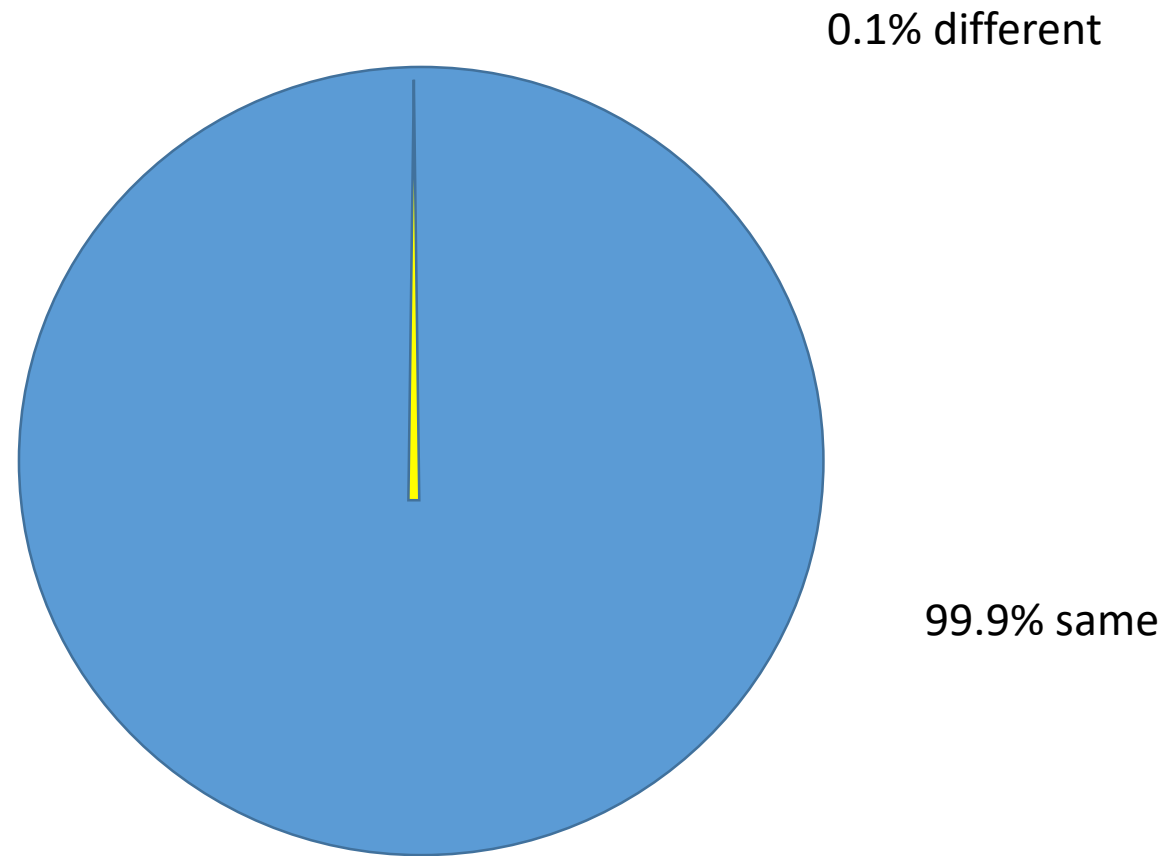
Σελίδα 30 στο eclass από  
αντιγραφή-επιδιόρθωση

- Η **ελικάση (helicase)** ξετυλίγει το διπλό κλώνο
- Η **πρωτεΐνη που συνδέεται με μονούς κλώνους DNA (SSB)...** αντικαθιστά το **RNA με DNA (λάθος)**  
**→ και τους σταθεροποιεί (σωστό)**
- Ο ολισθαίνων συνδετήρας (**sliding clamp**) κρατάει την DNA πολυμεράση συνδεδεμένη στο εκμαγείο

- Πως επιτυγχάνεται η γενετική σταθερότητα;
- Πως δημιουργούνται μεταλλάξεις (ή αποφεύγεται) η δημιουργία μεταλλάξεων;
- Ποια είναι η επίπτωση των μεταλλάξεων για το κύτταρο

Τι είναι η μετάλλαξη;

# Πόσο διαφέρει το γονιδίωμα μεταξύ των ανθρώπων;



# Είναι το DNA σταθερό μόριο;

## Χαρακτηριστικά που προσδίδουν σταθερότητα στο DNA

(α) **Δομή διπλής έλικας** με τις υδρόφιλες φωσφορικές ομάδες σε επαφή με το υδάτινο περιβάλλον και τις υδρόφοβες βάσεις στο εσωτερικό της έλικας να προστατεύονται από χημική προσβολή.

(β) Η παρουσία **δεσοξυριβόζης** (δεν έχει  $-OH$  στο 2' C σε αντίθεση με τη ριβόζη) δεν ευνοεί την υδρόλυση του μορίου (όπως στο RNA).

(γ) Το **στοίβαγμα** (stacking) των βάσεων προσδίδει επί πλέον σταθερότητα λόγω της ανάπτυξης δυνάμεων van der Waals.

(δ) Η **ηλεκτροστατική άπωση** μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων σε κάθε αλυσίδα καθιστά το μόριο σχετικά δύσκαμπτο (rigid), ενώ σε αντίθετες αλυσίδες διευκολύνει τον διαχωρισμό τους.

(ε) Οι **δεσμοί  $-H$**  προσανατολίζουν τις βάσεις στη σωστή τους θέση, συγκρατούν τη διπλή έλικα και συγχρόνως επιτρέπουν το άνοιγμα των αλυσίδων χωρίς μεγάλη κατανάλωση ενέργειας.

# Υφίσταται το DNA αλλαγές κατά τη ζωή του κυττάρου;

Εάν ναι, από ποιους παράγοντες;

**Εξωγενείς πηγές** (ακτινοβολίες, χημειοθεραπευτικά, χημικά-μεταλλαξιγόνα)

**Ενδογενείς πηγές** (δράση ελευθέρων ριζών/προϊόντα μεταβολισμού), λάθη κατά την αντιγραφή, Αντιγραφικό και μεταγραφικό στρες, αυτόματες/αυθόρμητες μεταβολές ή τροποποιήσεις βάσεων

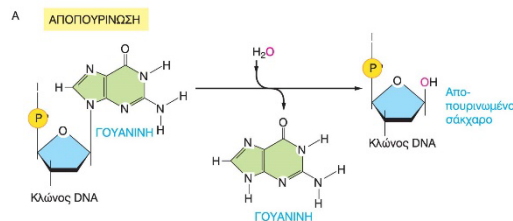
**Φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες** (μείωση, διαδικασίες που προκαλούν ποικιλότητα στην παραγωγή αντισωμάτων στα αναπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα)

Ποιες είναι οι αλλαγές;

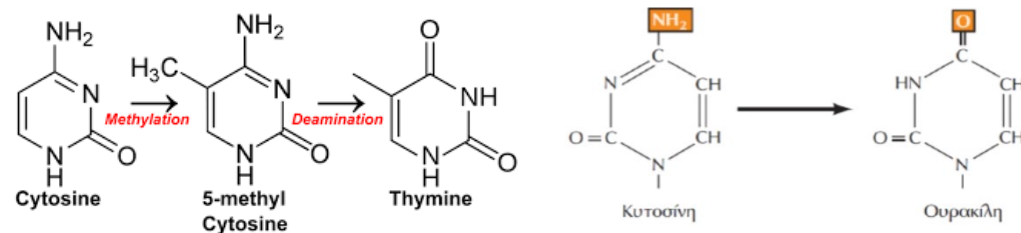
# Αλλαγές στο DNA

>200,000 αλλοιώσεις ανά κύτταρα ανά ημέρα

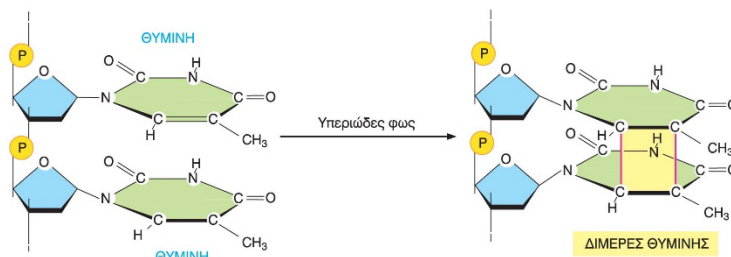
Απώλειες βάσεων (αποπουρίνωση)



Τροποποιήσεις βάσεων (μεθυλίωση, Απαμίνωση)



Διμερή πυριμιδινών



Αταίριαστες βάσεις (πχ από λάθη στην αντιγραφή)

Μονές ή διπλές θραύσεις

Damage Type (per cell per day)	#	%
Single-strand breaks	120,000	50.9
N <sup>7</sup> -MethylGuanine	84,000	35.6
Depurination	24,000	10.2
O <sup>6</sup> -MethylGuanine	3,120	1.3
8-oxo-7,8-dihydroguanine	2,880	1.2
Depyrimidation	1,320	0.5
Cytosine deamination	360	0.2
Pyrimidine dimers	200	0.1
Double-strand breaks	9	0.01
Interstrand cross-links	8	0.01

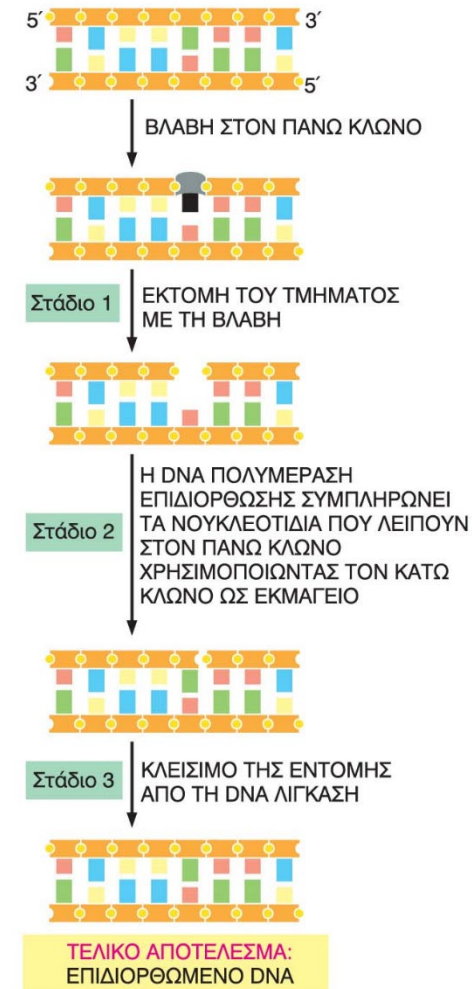
Lindahl et al.



# Μηχανισμοί επιδιόρθωσης εκτομής

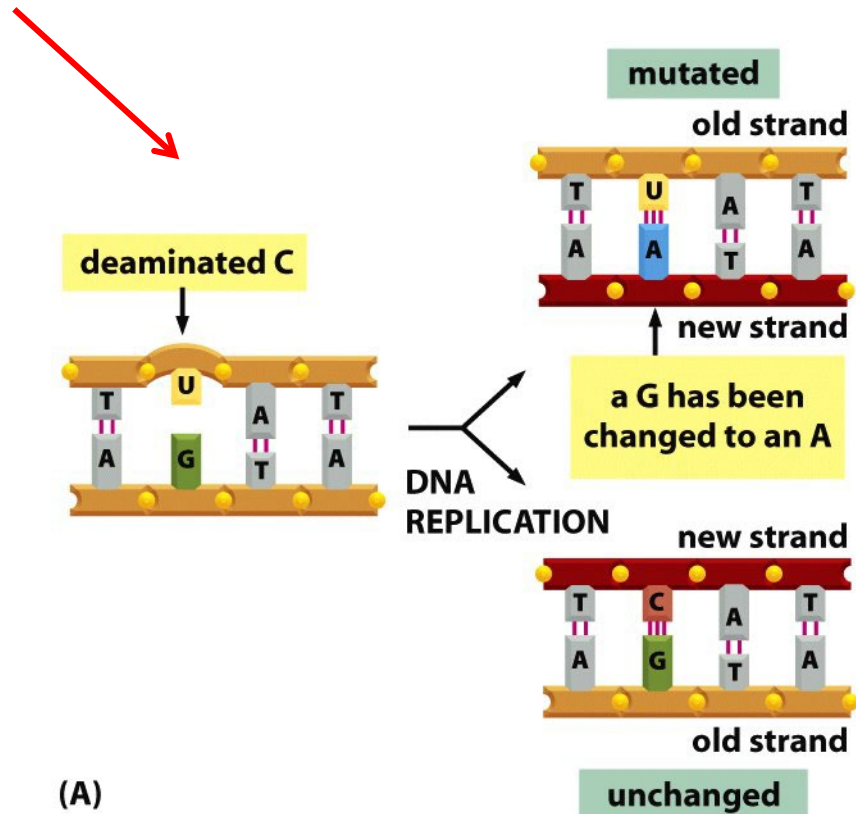
## Στάδια της βασικής οδού επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA

- Αναγνώριση των αταίριαστων βάσεων
- Διάσπαση του δεσμού για την αφαίρεση του νουκλεοτιδίου από νουκλεάσες
- Το κενό συμπληρώνεται από την DNA πολυμεράση
- Τα άκρα ενώνονται από την λιγάση



## Προσοχή!

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αντιλαμβάνονται και επιδιορθώνουν πρωτογενείς αλλοιώσεις (βλάβες) όχι μεταλλάξεις



(A)

- Οι μεταλλάξεις είναι μόνιμες αλλαγές στην αλληλουχία του DNA-όχι αλλοιώσεις στη δομή του

# Συχνότητα μεταλλάξεων

- Πρωτογενείς αλλοιώσεις που διαφεύγουν των μηχανισμών επιδιόρθωσης εγκαθίσταται ως μόνιμες μεταλλάξεις
- Φυσιολογικά σε χαμηλή συχνότητα
- Η συχνότητα αυξάνεται όταν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί υπολειτουργούν

**Η απόδοση των διορθωτικών μηχανισμών είναι τέτοια, που παρά τις συνεχείς και διαφόρων τύπων βλάβες, οι αλληλουχίες του DNA συντηρούνται τόσο καλά ώστε τα λάθη που τελικά συσσωρεύονται σε 1 έτος για 1 απλοειδές γαμετικό κύτταρο με γονιδίωμα  $3 \times 10^9$  bp, να μην υπερβαίνουν τις 10-20 αλλαγές βάσεων.**

**Ποιες οι επιπτώσεις συσσώρευσης μεταλλάξεων;**

-στα σωματικά κύτταρα;

-στα γαμετικά κύτταρα;

# Κληρονομούμενα σύνδρομα με βλάβες σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης

NAME	PHENOTYPE	ENZYME OR PROCESS AFFECTED
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	colon cancer (HNPCC)	mismatch repair
Xeroderma pigmentosum (XP) groups A–G	skin cancer, cellular UV sensitivity, neurological abnormalities	nucleotide excision-repair
XP variant	cellular UV sensitivity	translesion synthesis by DNA polymerase $\delta$
Ataxia–telangiectasia (AT)	leukemia, lymphoma, cellular $\gamma$ -ray sensitivity, genome instability	ATM protein, a protein kinase activated by double-strand breaks
BRCA-2	breast and ovarian cancer	repair by homologous recombination
Werner syndrome	premature aging, cancer at several sites, genome instability	accessory 3'-exonuclease and DNA helicase
Bloom syndrome	cancer at several sites, stunted growth, genome instability	accessory DNA helicase for replication
Fanconi anemia groups A–G	congenital abnormalities, leukemia, genome instability	DNA interstrand cross-link repair
46 BR patient	hypersensitivity to DNA-damaging agents, genome instability	DNA ligase I

# Μελανοχρωματική ξηροδερμία

- Οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίου (ΧΡΑ, ΧΡΒ, ΧΡC, ΧΡD, ΧΡΕ, ΧΡF).
- Σπάνιο σύνδρομο που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο
- Μεγάλη ευαισθησία στην έκθεση στο ηλιακό φως, ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος, νευρολογικές διαταραχές κ.α Κακώηθες μελάνωμα, καρκίνοι του επιθηλίου, Κακοήθεις όγκοι εγκεφάλου, πνευμόνων, στομάχου, λευχαιμίες κ.α
- The average life expectancy of those with the condition is about 30 years less than normal
- Συχνότητα εμφάνισης

The disease affects about 1 in 100,000 worldwide. By region, it affects about 1 in 370 in India, 1 in 20,000 in Japan, 1 in 250,000 people in the United States and 1 in 430,000 in Europe.

(children of the night/moon children)



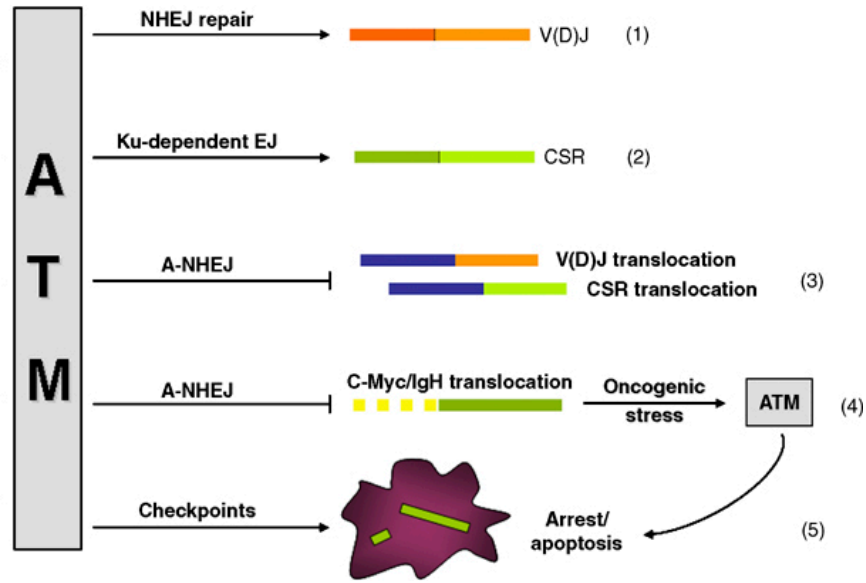
## Μη λειτουργικός μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων

- Σπάνιο σύνδρομο που οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίου (CSA, CSB)
- Αναπτυξιακές ανωμαλίες (νευρικό σύστημα κ.α), φωτοευαισθησία, πρόωρη γήρανση, μικροκεφαλία, καχεξία, καταρράκτης
- Σπάνιο σύνδρομο που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο
- Συχνότητα εμφάνισης 1:250000
- Life expectancy <20 years





# Αταξία Τηλαγγειεκτασία



ATM: Κινάση σερίνης θρεονίνης  
Επιδιόρθωση διπλών θραύσεων

- Αταξία
- Αυξημένη εμφάνιση καρκίνου
- Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος
- Αγγειοδιαστολή

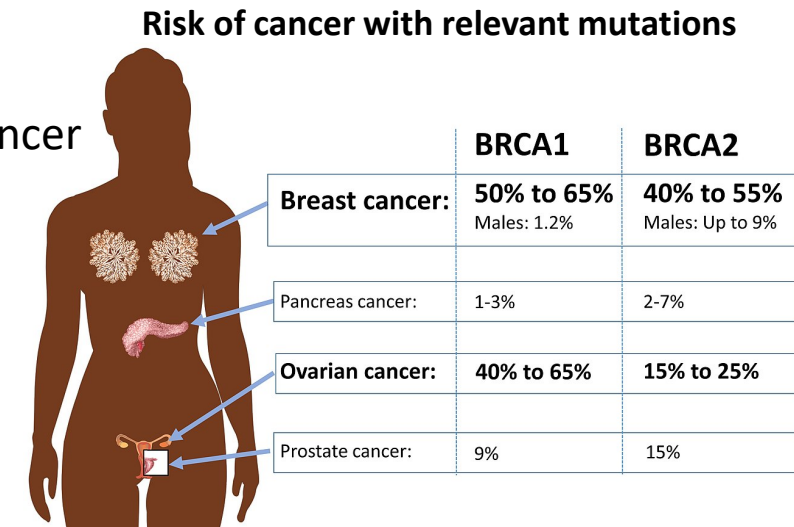




# Κληρονομικές μορφές καρκίνου και μεταλλάξεις σε γονίδια επιδιόρθωσης

Κληρονομικές μορφές καρκίνου του μαστού και ωοθηκών σχετίζονται με μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται σε επιδιόρθωση από ομόλογο ανασυνδυασμό όπως τα BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, RAD51C and RAD51D.

- Υπεύθυνος για το 14.7% (522,000) όλων των θανάτων γυναικών που σχετίζονται με καρκίνο
- Breast cancer:** About 13% of women in the general population will develop breast cancer sometime during their lives



επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό

## Mutations in Cancer Susceptibility Genes

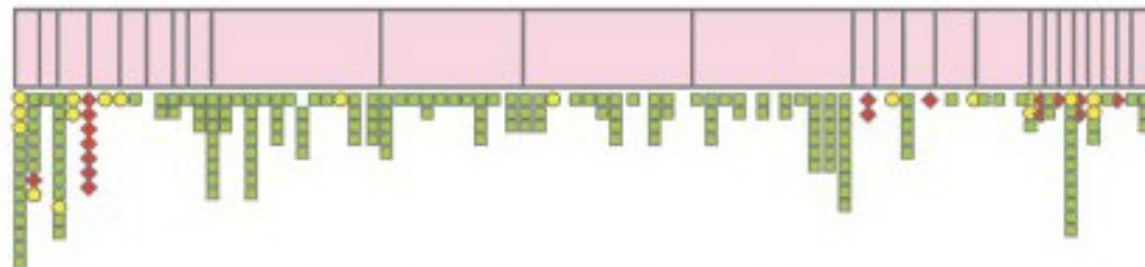
### *BRCA2*

- On chromosome 13
- Autosomal dominant transmission
- Protein has role in genomic stability
- ~300 different mutations reported



### *BRCA1*

- On chromosome 17
- Autosomal dominant transmission
- Protein has role in genomic stability
- ~500 different mutations reported



■ Nonsense/Frameshift    ● Missense    ◆ Splice-site

## Περίπτωση 1

Παιδί 8 ετών εμφανίζει καρκίνο του δέρματος.

Το δέρμα του είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο και φέρει φακίδες.

Διαγιγνώσκεται μελαχρωματική ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum, XP).

## Ερωτήσεις

- Σε τι οφείλεται η μελαχρωματική ξηροδερμία;
- Πως προκαλούνται βλάβες ή λάθη στο DNA; Εγγενείς (ενδοκυτταρικοί) και περιβαλλοντικοί παράγοντες.
- Πώς βλάβες στο DNA οδηγούν σε μεταλλάξεις ;
- Ποιους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA γνωρίζετε;
- Τι είναι η επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide excision repair, NER) και ποιους τύπους βλάβης επιδιορθώνει;
- Γιατί ασθενείς με ελαττωματικό μηχανισμό NER εμφανίζουν σε μεγάλη συχνότητα καρκίνου του δέρματος;

## Περίπτωση 2

Νεαρή γυναίκα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού πραγματοποιεί γενετικό τεστ για την ανίχνευση κληρονομικών μεταλλάξεων στο γονιδίωμά της που να προδιαθέτουν για καρκίνο του μαστού. Ανιχνεύεται μεταλλαγή στο γονίδιο BRCA1. Το γονίδιο αυτό εμπλέκεται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης μέσω ανασυνδυασμού (ανασυνδυαστική ή μετα-αντιγραφική επιδιόρθωση). Λόγω της ύπαρξης μεταλλαγής στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου BRCA1, η γυναίκα αυτή έχει 70% πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού και 40% πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών μέχρι το 70<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας της.

## Ερωτήσεις

- Ποιος είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης BRCA1 κατά την επιδιόρθωση του DNA;
- τι είναι η ανασυνδυαστική επιδιόρθωση και ποιους τύπους βλάβης επιδιορθώνει;
- Γιατί μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 προδιαθέτουν για καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών;

# Βλάβες, επιδιορθωτικοί μηχανισμοί και μεταλλάξεις

## A. Βλάβες του DNA

- Το DNA είναι σχετικά σταθερό χημικό μόριο, αλλά εξαιρετικά σταθερό πληροφοριακό μόριο, λόγω της διόρθωσης του DNA.
- Βλάβες προκαλούνται στο DNA από λάθη κατά την αντιγραφή του , από δράσεις εσωτερικών παραγόντων και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Φύση των βλαβών.

## B. Οι διορθωτικοί μηχανισμοί

- διορθώνουν πρωτογενείς βλάβες του DNA (όχι μεταλλάξεις)
- αναγνωρίζουν αλλοιώσεις στην δομή του DNA, όχι την αλληλουχία των βάσεων (ακόμα και στην περίπτωση απομάκρυνσης mismatch). Μπορεί να αναγνωρίζουν αλλαγμένες βάσεις που δεν υπάρχουν φυσιολογικά στο DNA (πχ η ουρακίλη και οι αλκυλιωμένες βάσεις αναγνωρίζονται και απομακρύνονται από γλυκοζυλάσες)
- περιλαμβάνουν σύστημα ελέγχου της ακεραιότητας και κανονικότητας του DNA
- περιλαμβάνουν συνήθως σύνθεση νέου DNA

## Γ. Δημιουργία μεταλλάξεων

- Η βλάβη του DNA είναι το πρωταρχικό γεγονός και η δημιουργία μετάλλαξης έπεται
- Μεταλλάξεις δημιουργούνται όταν δεν δρουν οι διορθωτικοί μηχανισμοί (αλλά και όταν δρουν μηχανισμοί επιρρεπείς σε λάθη) .

# Βλάβες σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και μεταλλάξεις

## **Δ. Τα γονίδια των επιδιορθωτικών μηχανισμών**

- **πάνω από 130 γονίδια στον άνθρωπο** κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι συστατικά **διαφόρων πρωτεϊνικών μηχανών** επιδιόρθωσης του DNA.
- Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να δυσλειτουργούν αν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες φέρουν **μεταλλάξεις**. Η δυσλειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA έχει σοβαρότατες συνέπειες για τον οργανισμό (παραδείγματα)

**Ε. Ο ρόλος των μηχανισμών διόρθωσης του DNA** είναι θεμελιώδης για δύο αντίθετες ιδιότητες της ζωής: τη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας αφενός και την παραγωγή γενετικής ποικιλότητας αφετέρου (η λεπτή ισορροπία ανάμεσα στα δυο εξασφαλίζει την συνέχιση **και** την εξέλιξη των ειδών στον πλανήτη).

Η εργασία θα είναι περίπου 1000 λέξεις και θα περιλαμβάνει:  
Μια παράγραφο για την ασθένεια, μία για το γονίδιο και μια για τον μηχανισμό

Gene	Defect	Hereditary syndrome	Cancer
ATM	DSB	Ataxia-telangiectasia	lymphoma, leukemia, breast
NBS1	DSB	Nijmegen breakage syndrome	lymphoma
BRCA1	HR	Familial breast cancer 1	breast, ovarian, prostate, colon
BRCA2	HR	Familial breast cancer 2	breast (female/male), ovary, prostate, pancreas
p53	CC	Li-Fraumeni syndrome	sarcoma, breast, brain, leukemia
MSH2 PMS2	MMR	HNPCC	colon, rectum, gastric, endometrium, ovarian, urinary organs
XPA-XPG	NER	Xeroderma pigmentosum	skin

Abbreviations: CC, cell cycle control; DSB, double-strand break repair; HR, homologous recombination repair; MMR, mismatch repair; NER, nucleotide excision break repair; NR, not reported; TCR, transcription coupled repair. Adapted from Bartek & Lukas (2001), Hoeijmakers (2001), Svejstrup JQ (2002).



# Οδηγίες για εργασία

## ΓΕΝΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΓΡΑΠΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Το κείμενο αυτό έχει ως στόχο να βοηθήσει τους φοιτητές στην εκπόνηση γραπτών εργασιών που αφορούν την Διδασκαλία Μικρών Ομάδων στο μάθημα της Βιολογίας Ι και ΙΙ.

### Δομή της εργασίας

Όλο το κείμενο πρέπει να έχει την **ίδια γραμματοσειρά** (εξαιρούνται οι τίτλοι και οι λεζάντες) με μέγεθος 11 ή 12 pt. Το κείμενο πρέπει να χωρίζεται σε παραγράφους με τίτλους.

**Το συνολικό κείμενο πρέπει να είναι περίπου 1000 λέξεις.**

Η εργασία κατατίθεται στο eclass σε μορφή doc, docx ή pdf.

Κάθε γραπτή εργασία πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής μέρη:

### ΕΞΩΦΥΛΛΟ

Το εξώφυλλο περιλαμβάνει τον **τίτλο της εργασίας, το όνομα και τον Α.Μ.** του φοιτητή.

### ΚΥΡΙΩΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

Πρόκειται για ένα αναλυτικό και **πρωτότυπο** κείμενο. Αυτό σημαίνει ότι ο/η φοιτητής/τρια **δεν** θα πρέπει να μεταφέρει αυτούσιες φράσεις, αποσπάσματα ή μεταφρασμένα τμήματα από άλλα κείμενα. Θα πρέπει να διαβάσει και να κατανοήσει τις πληροφορίες που εντοπίζει σε διδακτικό, επιστημονικό υλικό ή άλλες βιβλιογραφικές πηγές και να συνθέσει ένα δικό του/της πρωτότυπο κείμενο. Το κείμενο πρέπει να είναι σαφές, μεστό και επιστημονικά ορθό. Εκτενείς φράσεις ή ασαφή νοήματα πρέπει να αποφεύγονται. Πρέπει να χρησιμοποιείται η ορθή επιστημονική ορολογία (προσοχή: το google translator σπάνια τη γνωρίζει. Τα βιβλία σας έχουν λεξιλόγιο στο τέλος). Πέραν από τη μεταφορά πληροφοριών, το κείμενο είναι ευκαίιο να περιέχει κριτική αποτίμηση/συζήτηση της πληροφορίας.

Οι τίτλοι των παραγράφων προτιμάται να μην είναι περιγραφικοί αλλά να προσφέρουν πληροφορία για το περιεχόμενο της παραγράφου (πχ αντί για «Το γονίδιο x» είναι προτιμότερος ο τίτλος «Το γονίδιο x συμμετέχει στο γ»).

Σε περίπτωση που περιλαμβάνονται εικόνες, πίνακες ή διαγράμματα, πρέπει να υπάρχει **αρίθμηση** τους κάτω από την εικόνα (π.χ. Εικόνα 1) και **τίτλος/λεζάντα** στην οποία να γίνεται σύντομη αναφορά στο τι αφορά η εικόνα ή ο πίνακας και να αναφέρεται η πηγή σε περίπτωση που δεν έχει σχεδιαστεί από τον ίδιο τον φοιτητή. Επίσης πρέπει η εκάστοτε εικόνα να **αναφέρεται και εντός του κειμένου** μέσα σε παρένθεση (π.χ, Εικόνα 1), ώστε να αντιλαμβάνεται ο αναγνώστης ποιο εννοιολογικό τμήμα του κειμένου αφορά.

Μέσα στο κείμενο πρέπει να αναφέρονται οι βιβλιογραφικές παραπομπές (in text citations) στις πηγές που χρησιμοποιήθηκαν. Η αναφορά γίνεται με το όνομα του συγγραφέα και τη χρονολογία δημοσίευσης - σύστημα Harvard (Smith et al, 2019) ή με αρίθμηση που αντιστοιχεί στη βιβλιογραφική αναφορά στο τέλος του κειμένου. Οι βιβλιογραφικές παραπομπές σημειώνονται μέσα σε παρένθεση ( ) ή αγκύλη [ ] ή ως εκθέτης (όταν αφορά αρίθμηση). Παραθέτονται στο τέλος της φράσης που αφορούν (όχι όλες μαζί στο τέλος της παραγράφου).

Οι βιβλιογραφικές αναφορές πρέπει να είναι κατά προτίμηση δημοσιευμένα άρθρα από τη διεθνή βιβλιογραφία που έχουν υποστεί κρίση (peer reviewed), πχ από το Pubmed/Medline.



