

Επιδιόρθωση Κυτταρικών Βλαβών

ΜΑΘΗΜΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

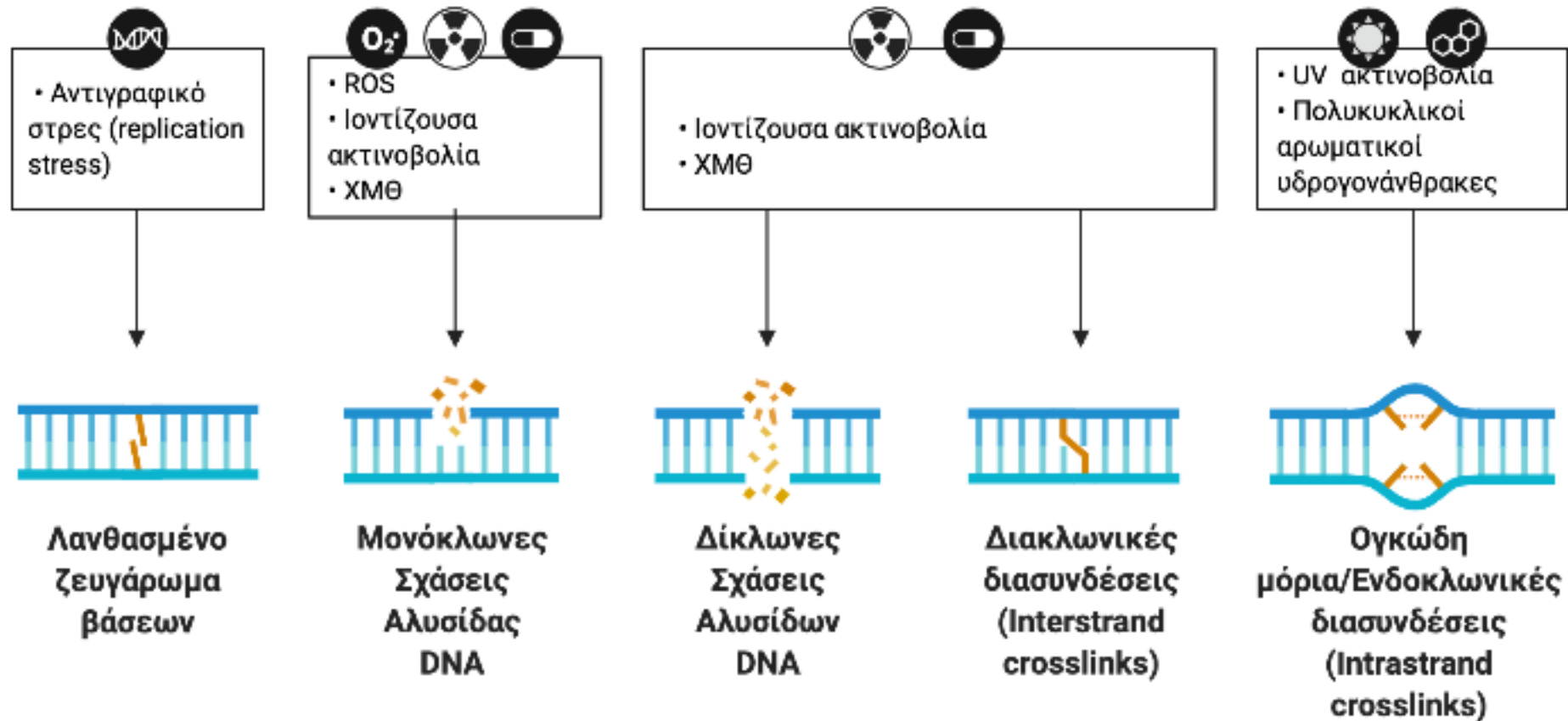
Κατσίδα Θεοδώρα, thkatsila@eie.gr
Μπαφίτη Παρασκευή, mpafiti@eie.gr
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών/ Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας

Περιεχόμενα Διάλεξης

1. Τι προκαλεί βλάβες στο DNA; Ποια είναι τα είδη των βλαβών;
2. Τα 6 R της Ακτινοθεραπείας
3. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών DNA



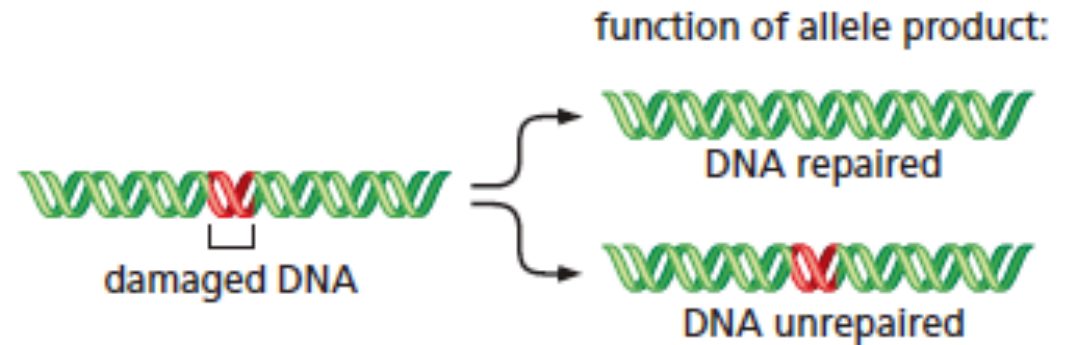
1. Τι προκαλεί βλάβες στο DNA;



Βλάβη ή Μετάλλαξη ;

Μεταλλάξεις του DNA: Αλλαγή βάσεων και στις δύο αλυσίδες του DNA. Δεν μπορούν να αναγνωριστούν διότι δεν υπάρχει σημείο σύγκρισης στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA και συνεπώς δεν μπορούν να επιδιορθωθούν.

Βλάβες στο DNA δύνανται να οδηγήσουν σε εσφαλμένη αντιγραφή του DNA και δημιουργία μεταλλάξεων.



Είδη Βλαβών DNA

1. Λάθη κατά την αντιγραφή του DNA
2. Αυθόρμητη Απαμίνωση Βάσεων
3. Αβασικές θέσεις
4. Οξείδωση DNA
5. Μεθυλίωση DNA
6. Προϊόντα UV ακτινοβολίας-διμερή πυριμιδίνης
7. Ενδοκλωνικές διασυνδέσεις (Intrastand crosslinks)
8. Διακλωνικές διασυνδέσεις (Interstand crosslinks)
9. Αλκυλίωση DNA
10. Ομοιοπολική σύνδεση ογκωδών μορίων
11. Μονόκλωνες σχάσεις DNA (single strand breaks, SSBs)
12. Αμφίκλωνες/ Δίκλωνες σχάσεις DNA (double strand breaks, DSBs)

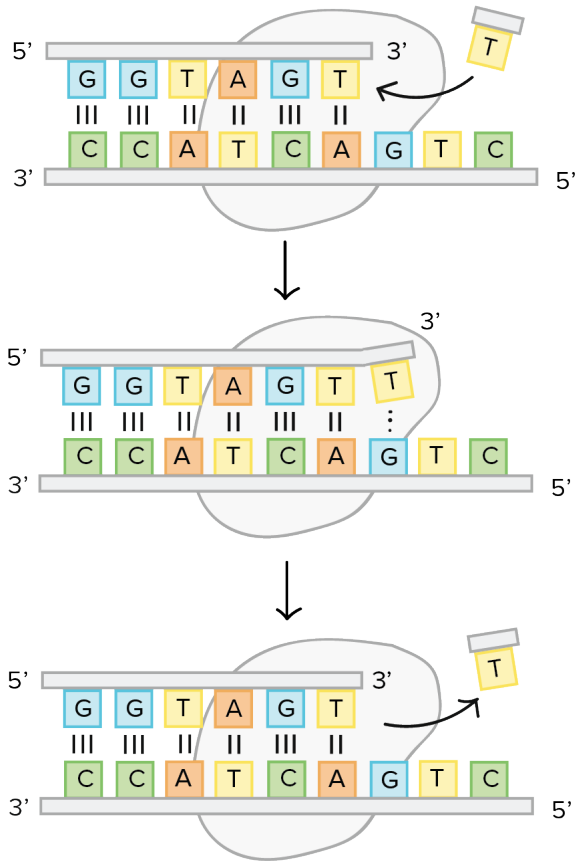
Ενδογενείς Παράγοντες



Εξωγενείς Παράγοντες



Λάθη κατά την αντιγραφή του DNA



Η πολυμεράση προσθέτει ένα λανθασμένο νουκλεοτίδιο στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA

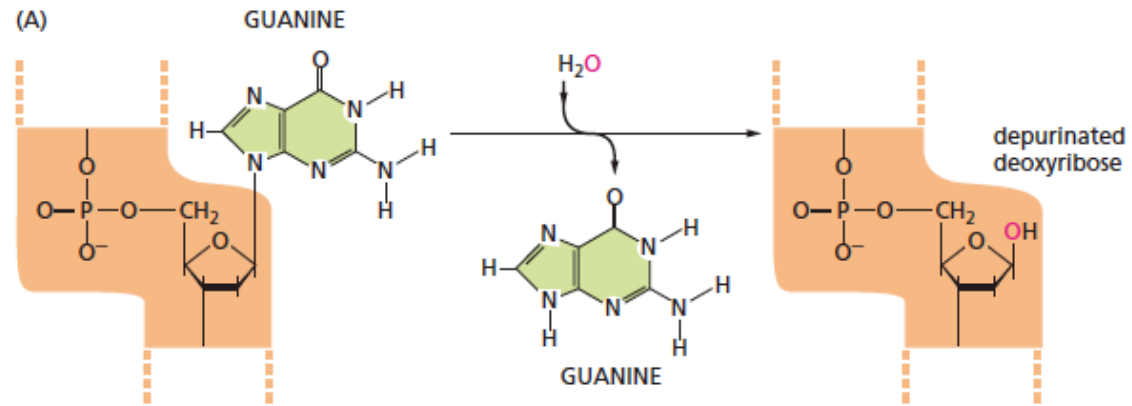
Η πολυμεράση εντοπίζει τις βάσεις που δεν ζευγαρώνουν σωστά

Η πολυμεράση μέσω της ενεργότητας 3'-5' εξωνουκλεάσης απομακρύνει το λανθασμένο νουκλεοτίδιο

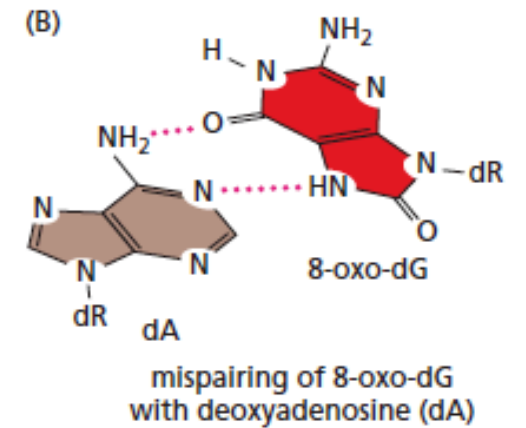
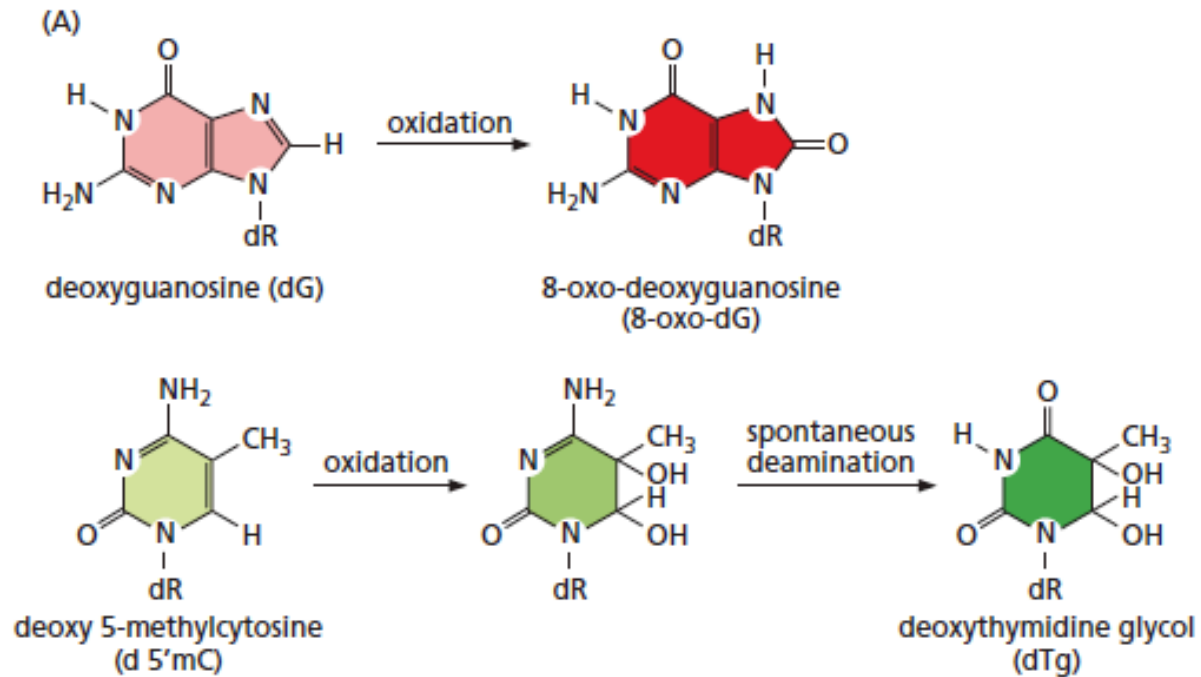


Λάθη των DNA πολυμερασών (DNA pol δ) κατά την αντιγραφή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών

Αβασικές θέσεις

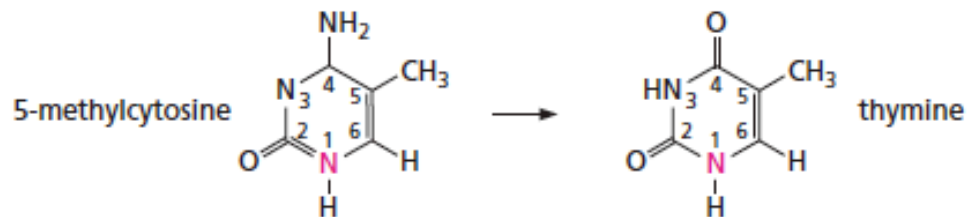
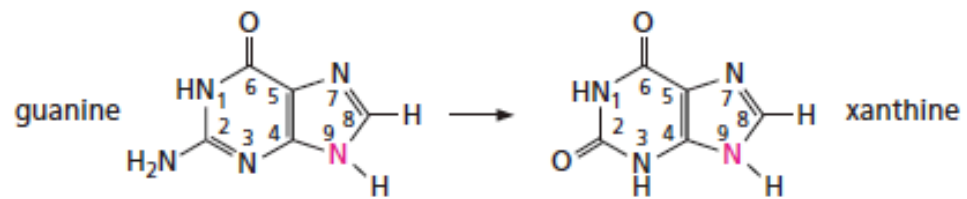
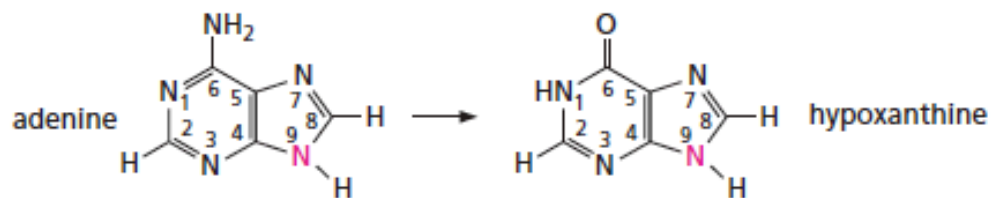
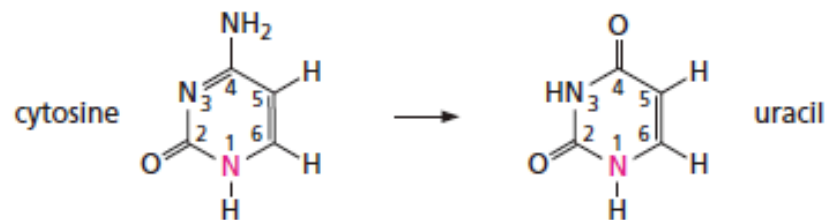


Οξείδωση DNA

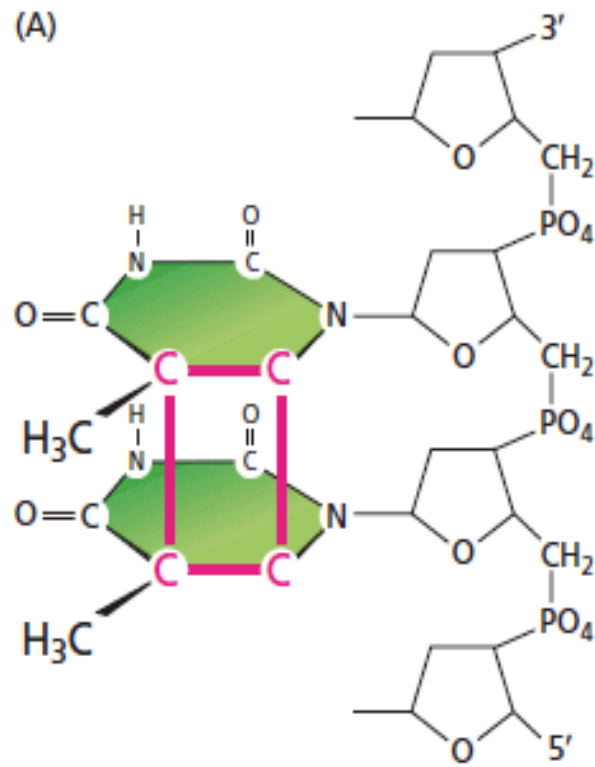


Απαμίνωση Βάσεων

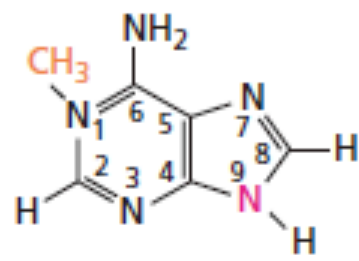
(B)



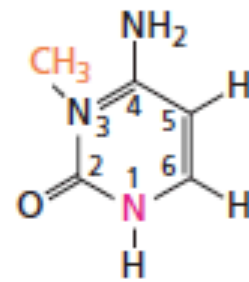
Προϊόντα UV
ακτινοβολίας-διμερή
πυριμιδίνης



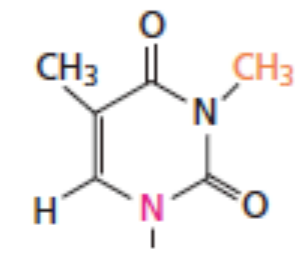
Αλκυλίωση DNA



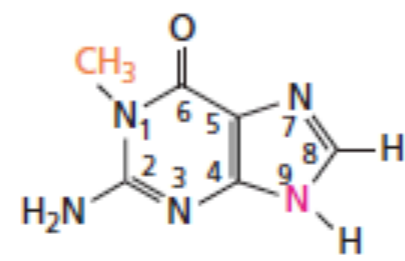
1-methyladenine



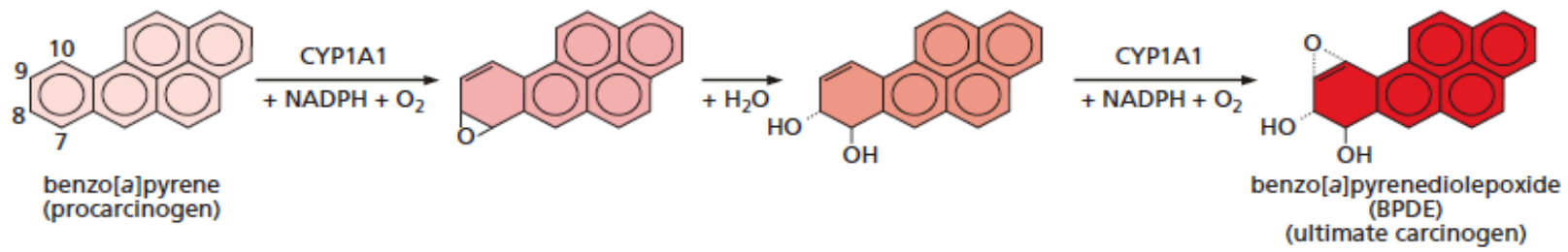
3-methylcytosine



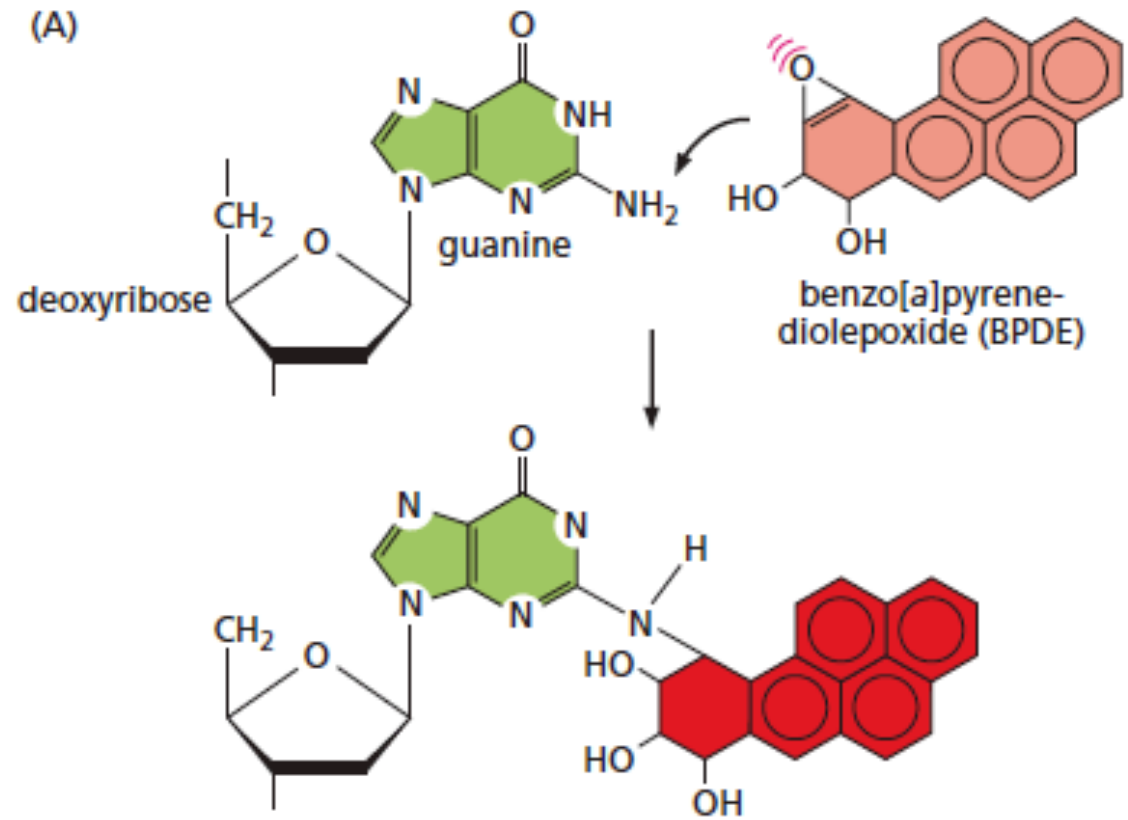
3-methylthymine



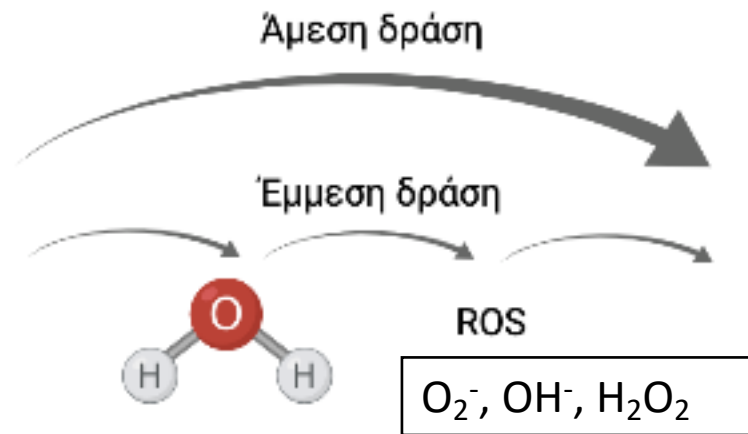
1-methylguanine



Ομοιοπολική σύνδεση ογκωδών μορίων



Δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας (IR)



Base and sugar damage



Single strand break



Double strand breaks

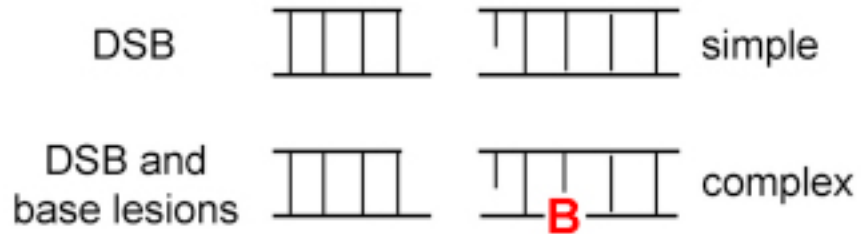


Double strand break fragments

Ομαδοποιημένες/σύνθετες βλάβες (clustered/complex DNA lesions)

- Υπαρξη 2 ή περισσότερων βλαβών σε κοντινή απόσταση, δηλαδή μέσα σε 1 ή 2 περιστροφές της έλικας του DNA.

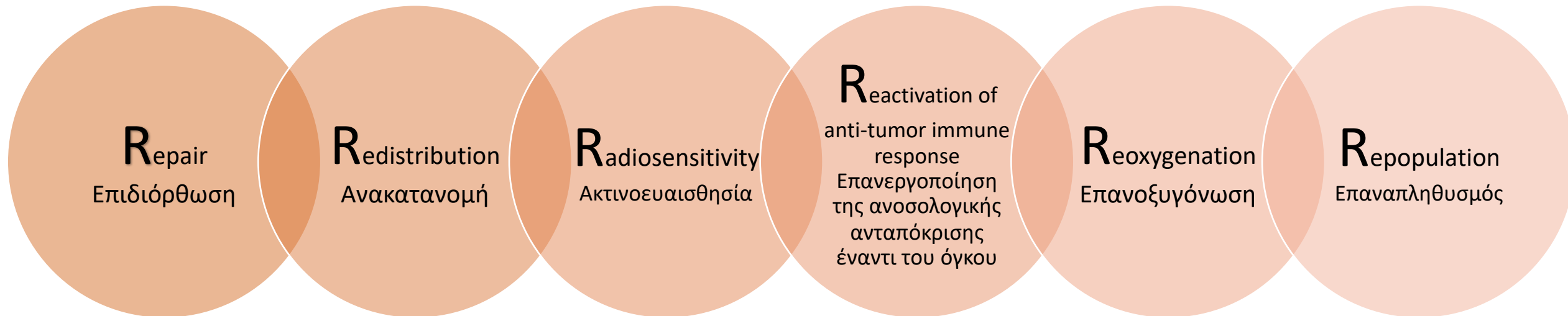
DSB-Clustered DNA Damage



Non-DSB-Clustered DNA Damage

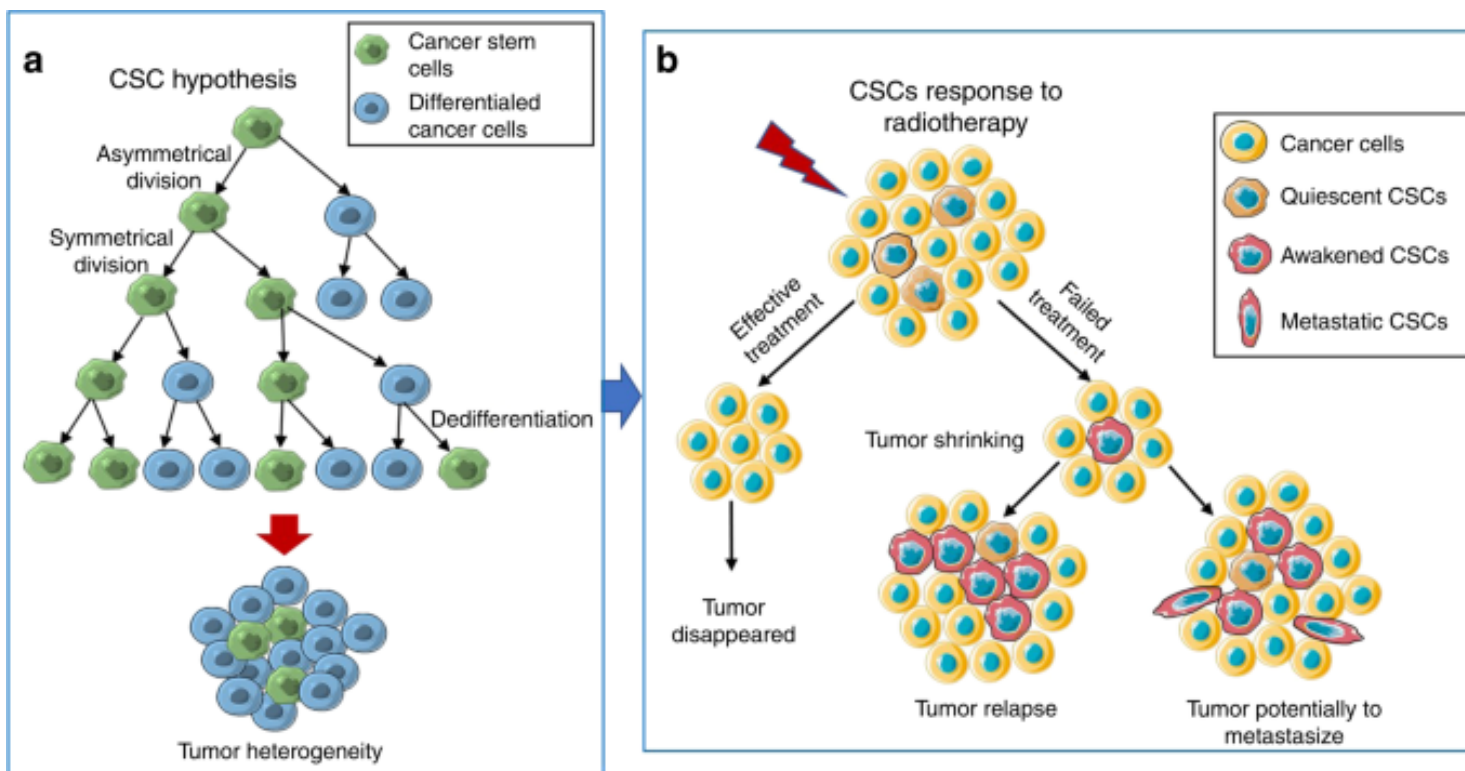


2. Τα 6 R της Ακτινοθεραπείας

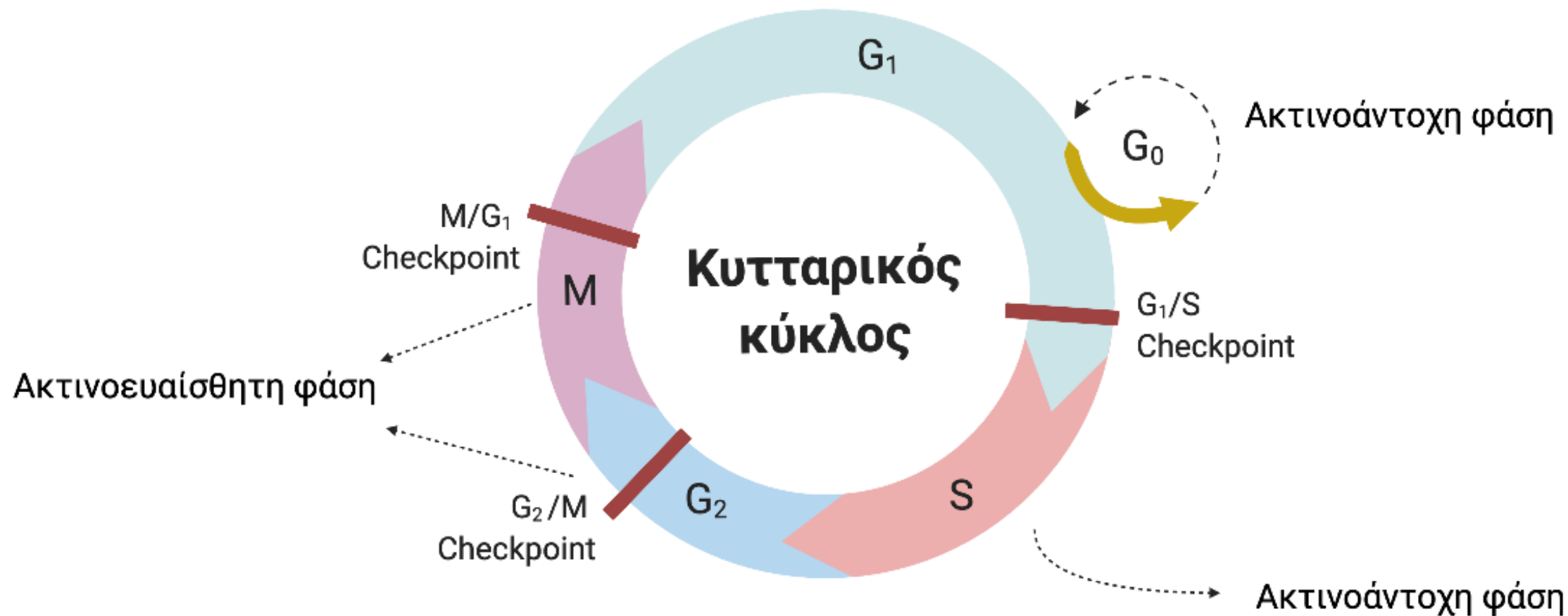


Repair/ Επιδιόρθωση: Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν μεγαλύτερη ικανότητα επιδιόρθωσης της βλάβης από τα καρκινικά. Στην κλασματοποιημένη ΑΚΘ ανάμεσα στις συνεδρίες γίνεται επιδιόρθωση της βλάβης.

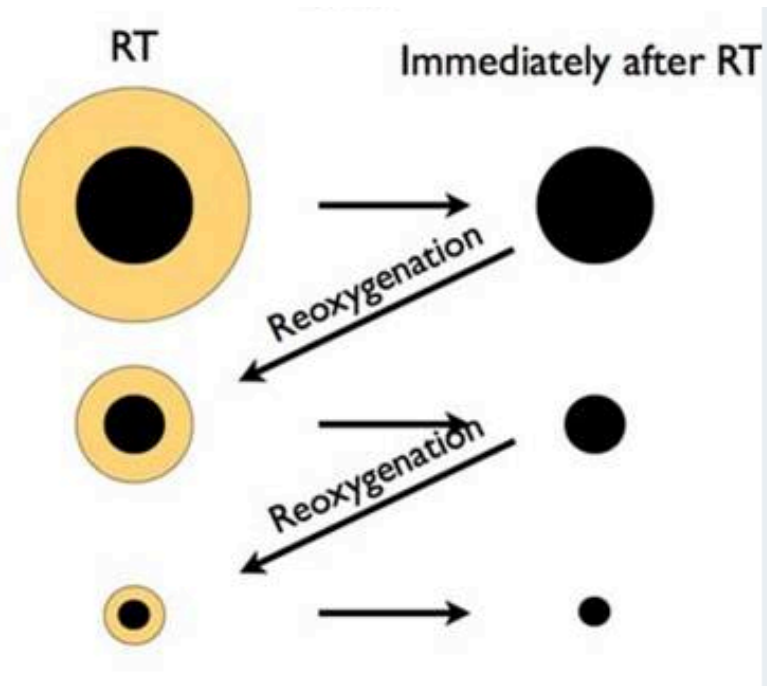
Reropulation/ Επαναπληθυσμός: Κάθε κλάσμα ΑΚΘ οδηγεί σε ορισμένη μείωση στον πληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα που επιβιώνουν οδηγούν σε επαναπληθυσμό. Ο επαναπληθυσμός είναι σημαντικός σε όγκους με βλαστικά κύτταρα, που αναπαράγονται γρήγορα και σε οξέος ανταποκρινόμενους όγκους (δέρμα, ΓΕΣ, βλεννογόνας).



Redistribution/ Ανακατανομή: Η ανακατανομή στον κυτταρικό κύκλο καθιστά τον κυτταρικό πληθυσμό πιο ευαίσθητο στην κλασματοποιημένη ΑΚΘ, σε σχέση με την εφάπαξ χορήγηση ΑΚΘ



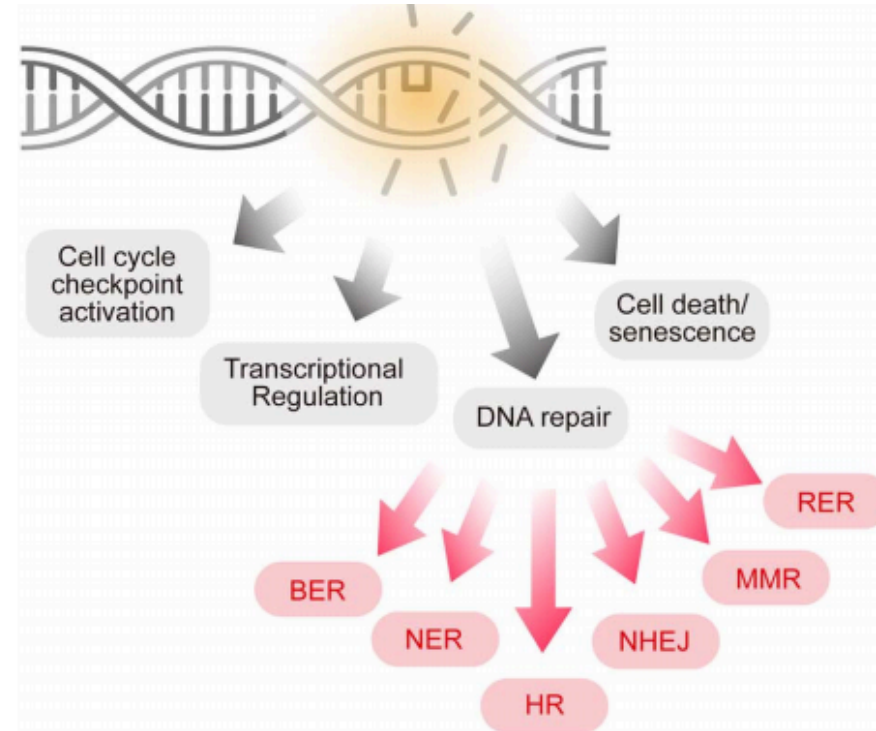
Reoxygenation/ Επανοξυγόνωση: Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη σταθεροποίηση της βλάβης, που προκαλεί η ΑΚΘ. Οι ευοξικοί όγκοι είναι περίπου 2,5 φορές πιο ακτινοευαίσθητοι από τους υποξικούς. Η επανοξυγόνωση συμβάλλει σημαντικά στην ακτινοευαισθησία των όγκων κατά την κλασματοποιημένη ΑΚΘ



Radiosensitivity/ Ακτινοευαισθησία: Μέτρο της ακτινοευαισθησίας είναι το ποσοστό των κυττάρων που επιβιώνουν μετά από μια συγκεκριμένη δόση ακτινοβολίας. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ποσοστό των κυττάρων που επιβιώνουν μετά από δόση ακτινοβολίας 2 Gy

3. Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης βλαβών DNA

- Αναγνώριση και επιδιόρθωση βλαβών DNA, κατά κύριο λόγο, χρησιμοποιώντας ως καλούπι την πληροφορία από τη συμπληρωματική αλυσίδα
- > 160 διακριτές πρωτεΐνες συμμετέχουν στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών DNA στα κύτταρα θηλαστικών
- Πραστατεύουν από μεταλλάξεις, που θα μεταβιβαστούν στα θυγατρικά κύτταρα και γενωμική αστάθεια



Σηματοδοτικό μονοπάτι απόκρισης στη βλάβη (DDR) και σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

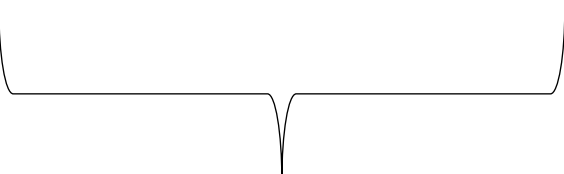
Δίκλωνες ρήξεις DNA



Μονόκλωνο DNA + πρωτεΐνη RPA



Καθυστερούν ή σταματούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου, μέσω παρεμπόδισης των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs)



Ενίσχυση Επιδιόρθωσης

Όταν η επιδιόρθωση του DNA είναι αποτελεσματική, η απόκριση στη βλάβη του DNA απενεργοποιείται, επιτρέποντας τη συνέχιση της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων. Εναλλακτικά, αν η βλάβη δεν μπορεί να απομακρυνθεί, η παρατεταμένη απόκριση στη βλάβη προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο, μέσω απόπτωσης ή κυτταρικής γήρανσης

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA

- Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (Mismatch Repair-MMR)

Διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA τα οποία οδηγούν στην εισαγωγή λανθασμένων (αλλά όχι αλλοιωμένων) βάσεων

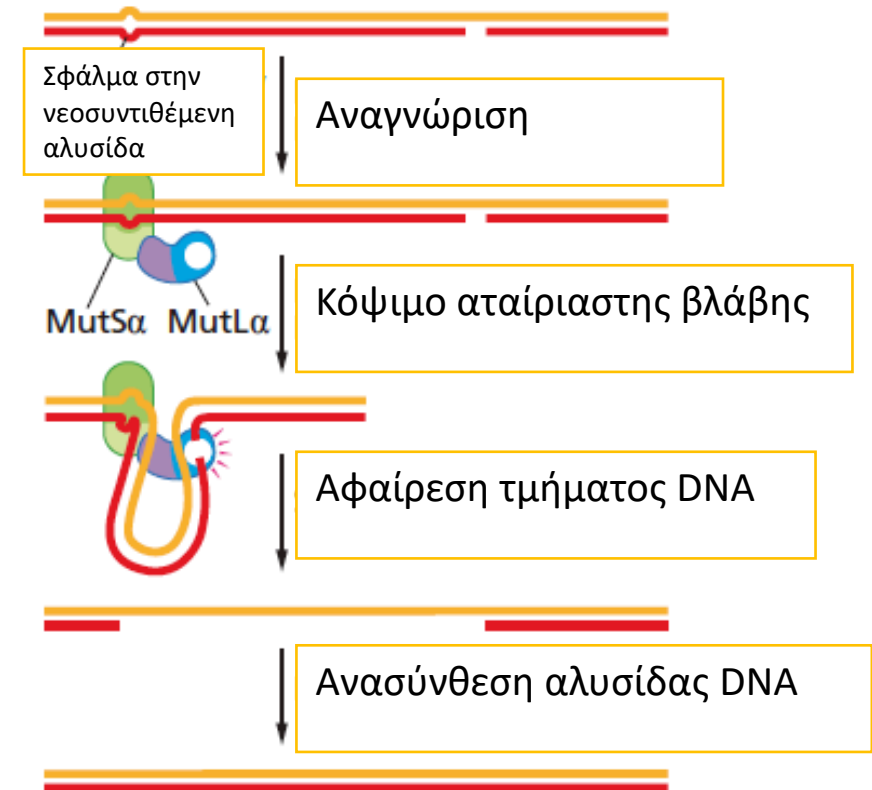
MutSα (MSH2/MSH6): αναγνωρίζει ένα μόνο λάθος ζευγάρωμα βάσεων ή μικρές θηλειές, που δημιουργούνται από προσθήκη/απαλοιφή 1-2 νουκλεοτιδίων

MutSβ (MSH2/MSH3): είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση μεγαλύτερων θηλειών, που δημιουργούνται από την προσθήκη/απαλοιφή, περίπου 16 νουκλεοτιδίων. Σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των αταίριαστων βάσεων διαδραματίζει ο **αντιγραφικός ολισθητήρας PCNA**

MutLα (MLH1/PMS2): κόβει την 3' ή 5' πλευρά της αταίριαστης βάσης στην αλυσίδα, που έχει την ασυνέχεια, κατά τρόπο που εξαρτάται από τα MutSα, PCNA, RFC και ATP

5'-3' εξωνουκλεάση EXO1: αφαιρείται το τμήμα DNA, που έχει κοπεί, σε συνεργασία με την πρωτεΐνη RPA

DNA πολυμεράση δ, DNA λιγάση I: ανασύνθεση



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA

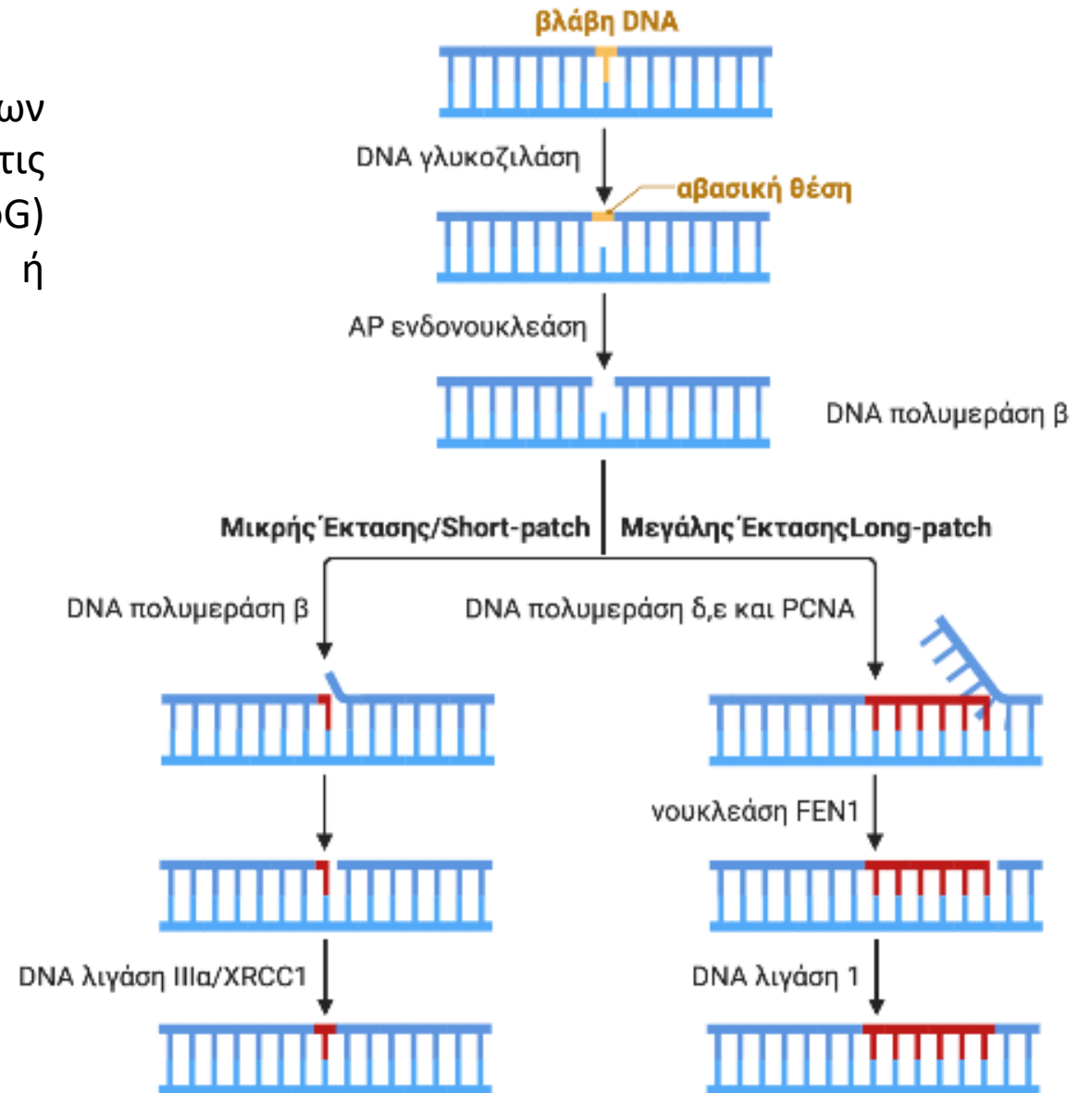
- Επιδιόρθωση εκτομής βάσεων (Base Excision Repair- BER)

Ο μηχανισμός BER ασχολείται κυρίως με μικρές βλάβες των νουκλεοτιδικών βάσεων. Κόβει και αντικαθιστά τις λανθασμένες (πχ ουρακίλη) ή τις κατεστραμμένες (πχ 8-οχοG) βάσεις που προκαλούνται από απαμίνωση, οξείδωση ή αλκυλίωση.

* Συμμετοχή **PARP** και **PNK** για επιδιόρθωση ssb με το BER

PARP: Προσδένεται σε σπασίματα του DNA και συνθέτει αλυσίδες όλιγο- ή πολύ-(ADP-ριβόζης), χρησιμοποιώντας NAD⁺

PNK: Είναι ένζυμο που διαθέτει ενεργότητα 3'-DNA φωσφατάσης και 5'-DNA κινάσης



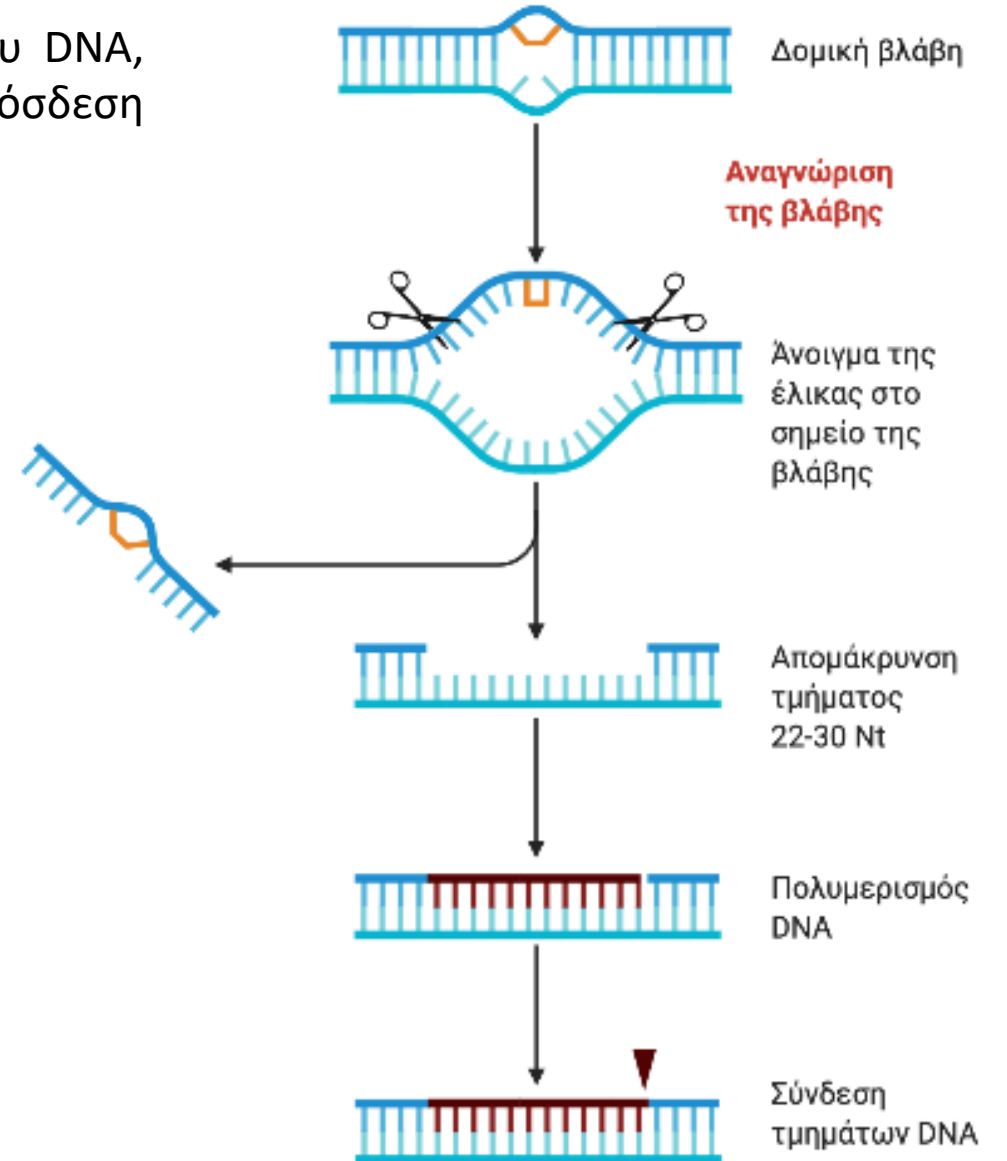
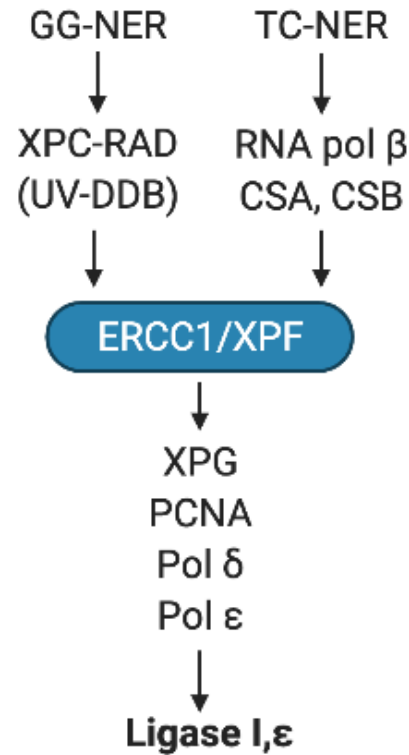
Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA

- Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair-NER)

Διορθώνει βλάβες οι οποίες παραμορφώνουν τη δομή της έλικας του DNA, όπως ο σχηματισμός διμερών πυριμιδινών και η ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων

Transcription Coupled Repair (TCR): διορθώνει βλάβες, που εμποδίζουν την RNA polIII και επιδιορθώνει γονίδια, που εκφράζονται

Global Genomic Repair (GGR): διορθώνει βλάβες σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες δεν εκφράζονται (ετεροχρωματίνη)



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA: κοινά χαρακτηριστικά

- Συμμετοχή πληθώρας πρωτεϊνών για την επιδιόρθωση της βλάβης
- Εξειδίκευση στην αναγνώριση και επιδιόρθωση του είδους της βλάβης
- Στάδια επεξεργασίας και επιδιόρθωσης: αναγνώριση βλάβης, αφαίρεση λανθασμένων νουκλεοτιδίων, συμπλήρωση του κενού από DNA πολυμεράση, συγκόλληση της επιδιορθωμένης αλυσίδας DNA
- Απενεργοποίηση των μηχανισμών ή μη ορθή λειτουργία οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων, προδιάθεση για καρκινογένεση και εμφάνιση συνδρόμων στον άνθρωπο

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης δίκλωνων ρήξεων στο DNA

- Κλασικός μηχανισμός σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Classical Non Homologous End Joining, Classical NHEJ)

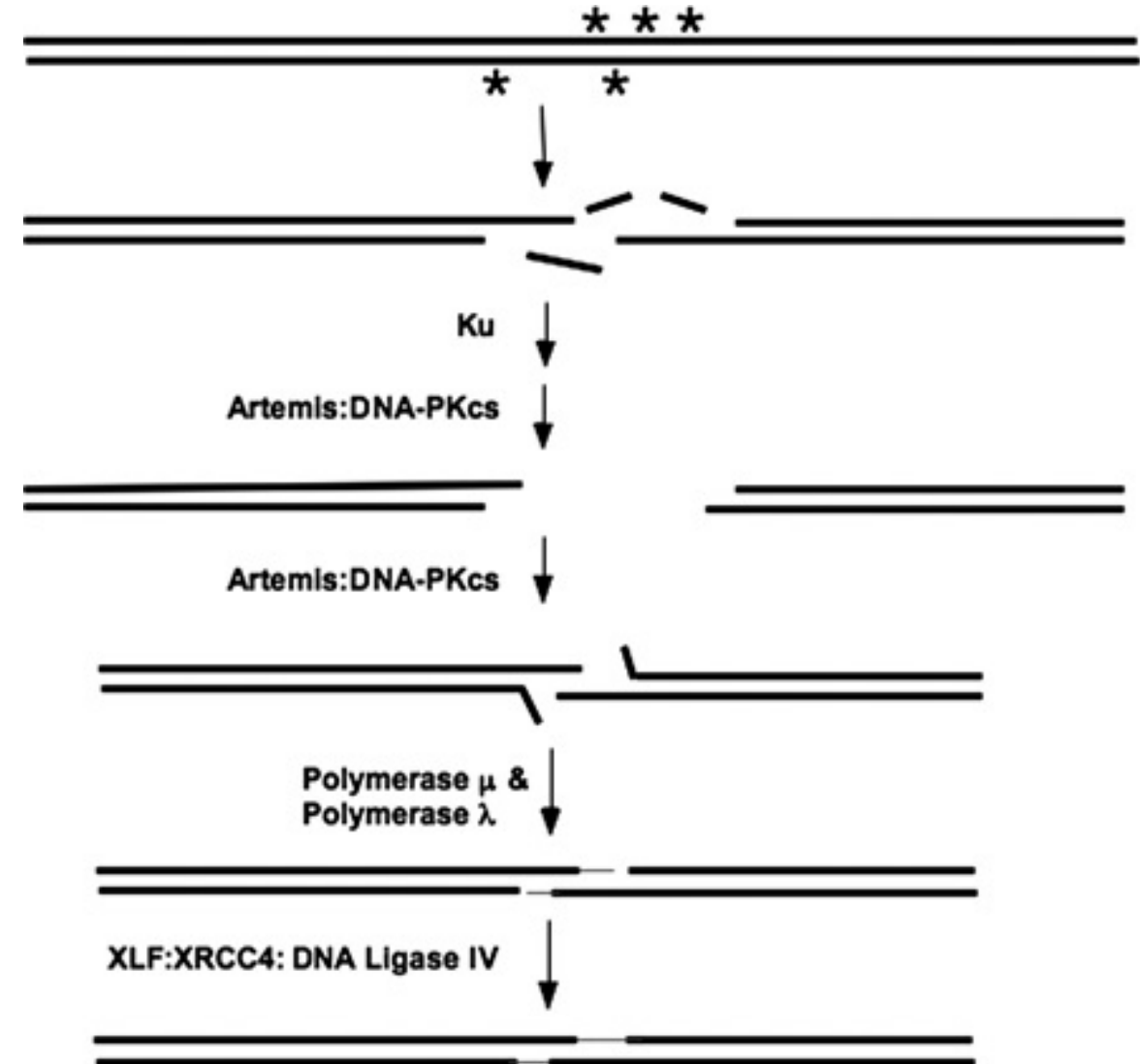
Ενεργοποίηση καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ιδιαίτερα, κατά τη φάση G1

Επιρρεπής στα λάθη: Η αρχική αλληλουχία δεν αποκαθίσταται πιστά

Ετεροδιμερές **Ku70/Ku80:**
προσδένεται στα άκρα του DNA και προσελκύει την **DNA-PKcs**

ARTEMIS: 5',3' εξωνουκλεάση και λανθάνουσα ενδονουκλεάση

Επεξεργασία σπασμένων άκρων και προετοιμασία για σύνδεση



- Εναλλακτικός μηχανισμός σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Alternative non Homologous end joining- alt NHEJ)

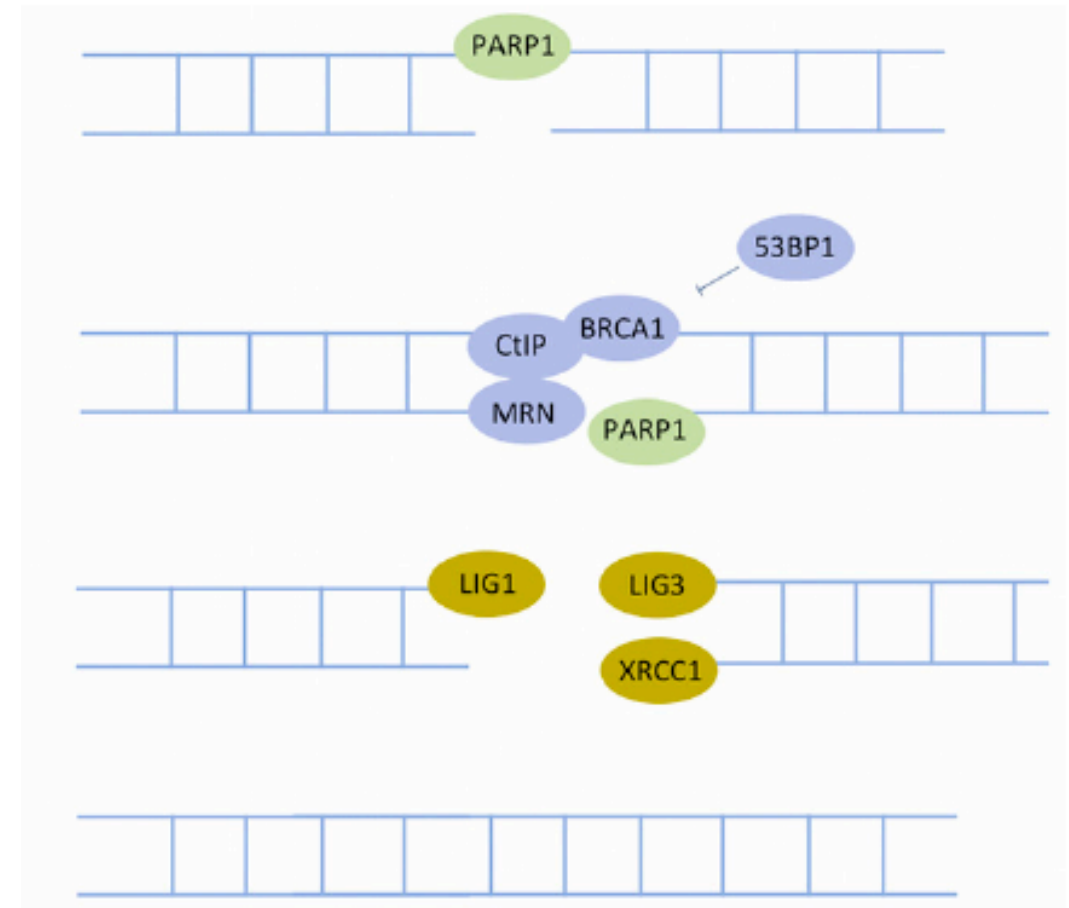
Λειτουργεί ως εφεδρικός του κλασικού NHEJ

Ανεξάρτητος της πρωτεΐνης **Ku**

PARP: προωθεί το μηχανισμό alt-NHEJ

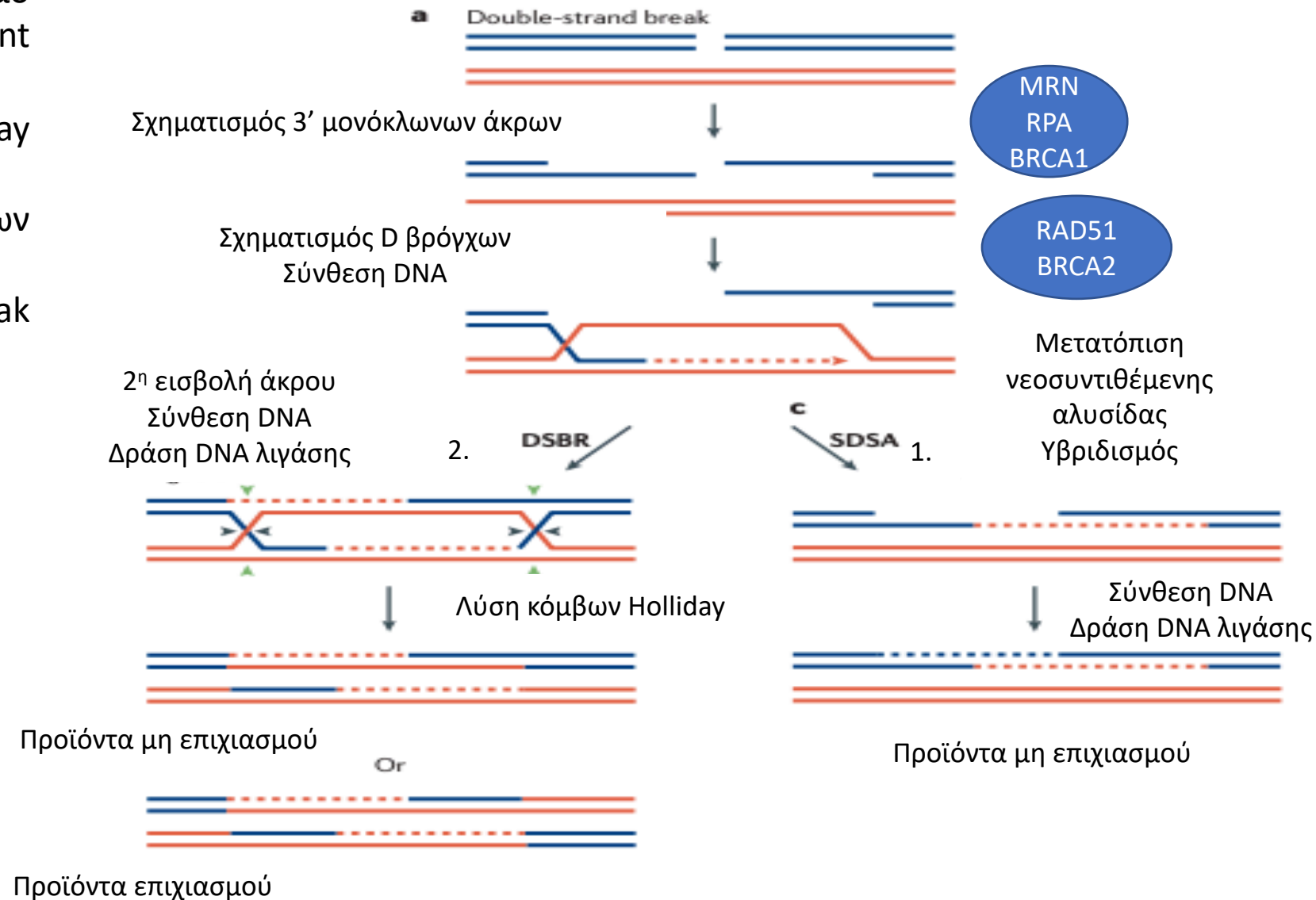
CtIP και **MRN**: περιορισμένη εκτομή των δικλωνικών θραύσεων που μεσολαβείται από περιοχές μικρο-ομολογιών σε μονόκλωνο DNA

XRCC1/LIG3 : τελικό βήμα στην επιδιόρθωση



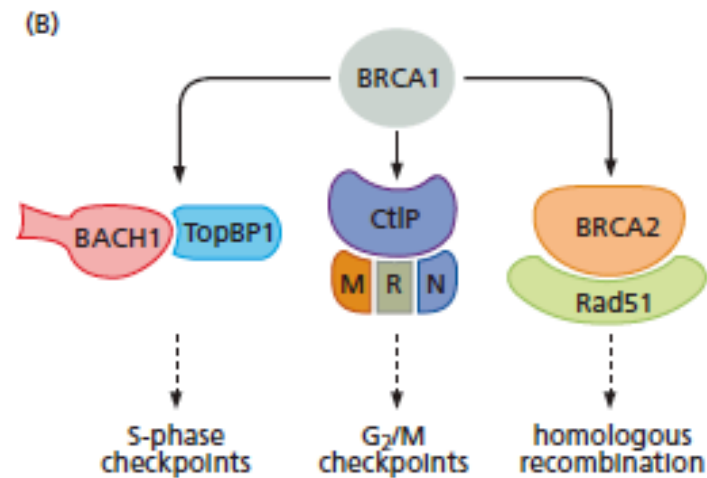
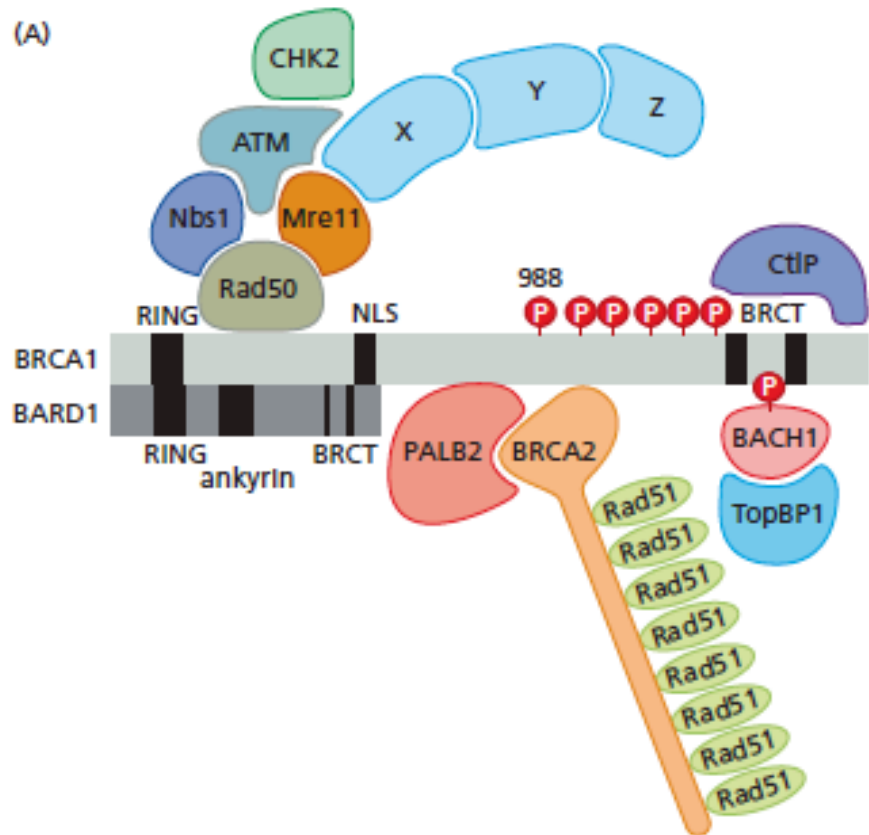
- Μηχανισμός εξαρτώμενος από τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination, HR)

1. Σύνθεση εξαρτώμενη από τον υβριδισμό των αλυσίδων DNA (SynthesisDependent Strand-Annealing, **SDSA**)
2. Δημιουργία διπλών κόμβων Holliday (Double Holliday Junction, **dHJ**)
3. Υβριδοποίηση εκτεθειμένων μονόκλωνων άκρων (Single Strand Annealing, **SSA**)
4. Αντιγραφή επαγόμενη από ρήξη (Break Induced Replication, **BIR**)



- Μηχανισμός εξαρτώμενος από τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination, HR)

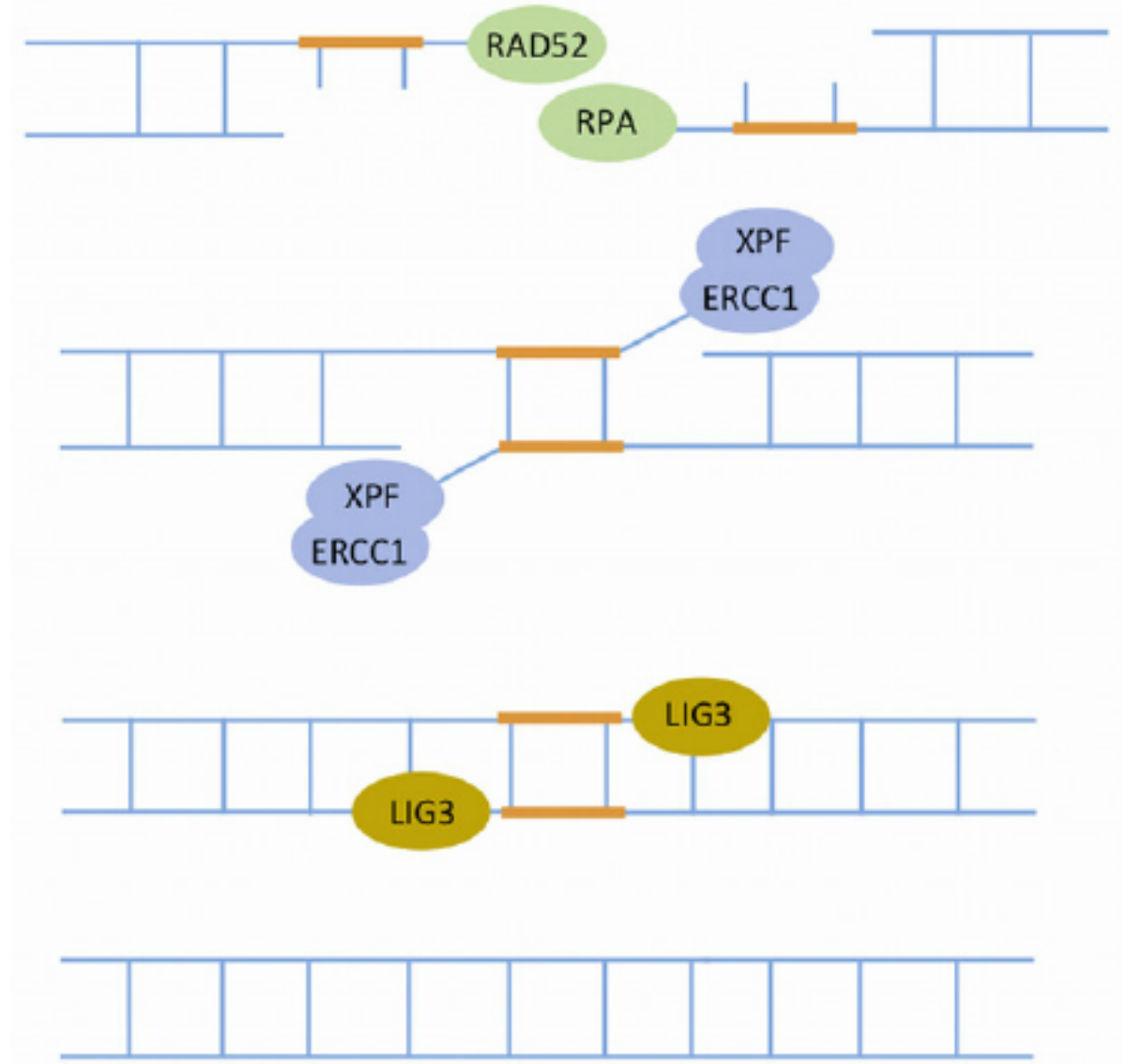
Η εκτομή των δικλωνικών θραύσεων επάγεται, κυρίως, στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου, όταν οι αδερφές χρωματίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ομόλογο ανασυνδυασμό



- Υβριδοποίηση εκτεθειμένων μονόκλωνων άκρων (Single Strand Annealing,SSA)

Λαμβάνει χώρα, όταν η εκτομή αποκαλύπτει ομόλογες επαναλήψεις, που πλαισιώνουν τη θραύση και μπορούν να υβριδιστούν, οδηγώντας σε απαλοιφή των μεσολαβούμενων αλληλουχιών

Εξαρτάται από την πρωτεΐνη Rad52 και δεν περιλαμβάνει την εισβολή κλώνων, επομένως, είναι ανεξάρτητος της πρωτεΐνης ανασυνδυασμού Rad51



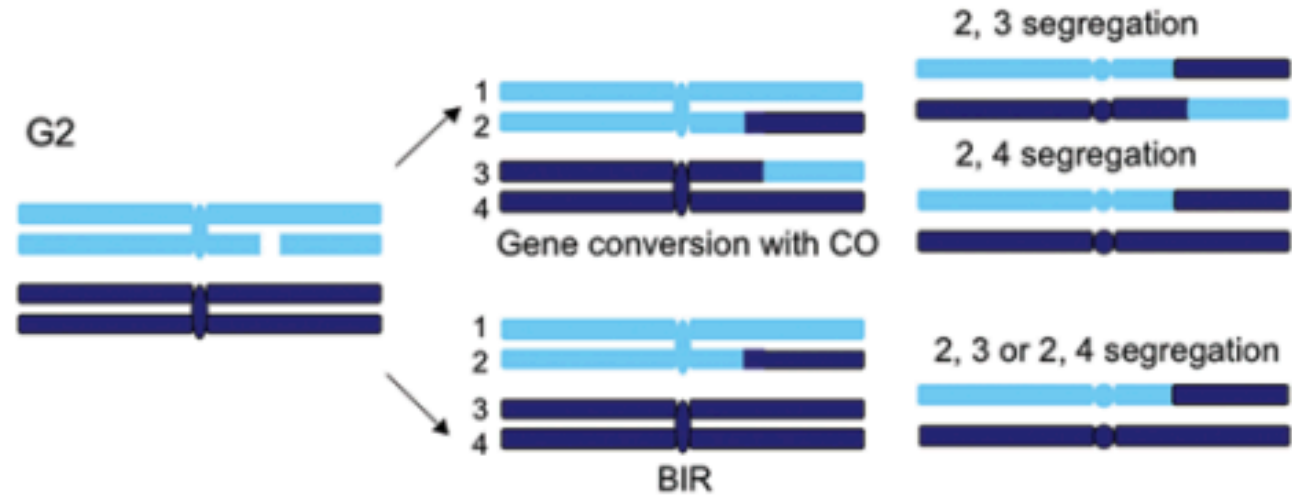
- Αντιγραφή επαγόμενη από ρήξη (Break Induced Replication, BIR)

Πραγματοποιείται, όταν ένα άκρο της δικλωνικής ρήξης υφίσταται εισβολή σε ένα ομόλογο χρωμόσωμα

Οδηγεί στο σχηματισμό μιας αντιγραφικής διχάλας μονής κατεύθυνσης

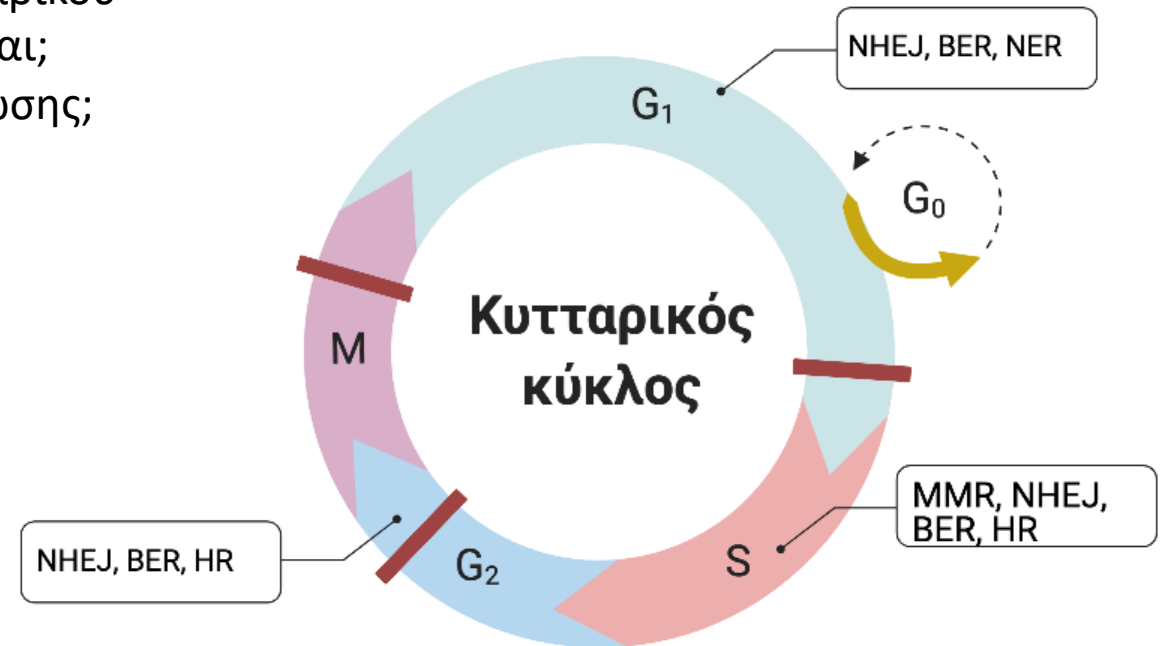
Σημαντικός στη διατήρηση των τελομερών μέσω του ανασυνδυασμού

Είναι ιδιαίτερα μεταλλαξογόνος, οδηγεί σε απώλεια της ετεροζυγωτίας, ενώ στην περίπτωση που η πρότυπη αλληλουχία βρίσκεται εκτοπικά, οδηγεί σε μη αμοιβαία μετατόπιση



Τελικά Σημεία

- Με ποιον τρόπο η IR προκαλεί βλάβες στο DNA;
- Ποια είναι τα κυριότερα είδη βλαβών;
- Που βασίζεται η αποτελεσματικότητα της κλασματοποιημένης ΑΚΘ, σύμφωνα με τα 6R της ΑΚΘ;
- Πώς αποκρίνεται το κύτταρο παρουσία βλαβών στο DNA;
- Ανάλογα με το είδος της βλάβης και τη φάση του κυτταρικού κύκλου, ποιος μηχανισμός επιδιόρθωσης ενεργοποιείται;
- Ποια είναι τα κύρια στάδια των μηχανισμών επιδιόρθωσης;



Ερωτήσεις ;