

Μοριακά μονοπάτια του κυττάρου: Σημασία στην ομοιόσταση και στη νόσο (1)

Κεφάλαιο 1, Robbins Βασική Παθολογική Ανατομική, 10^η έκδοση



PATRAS UNIVERSITY HOSPITAL AND SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



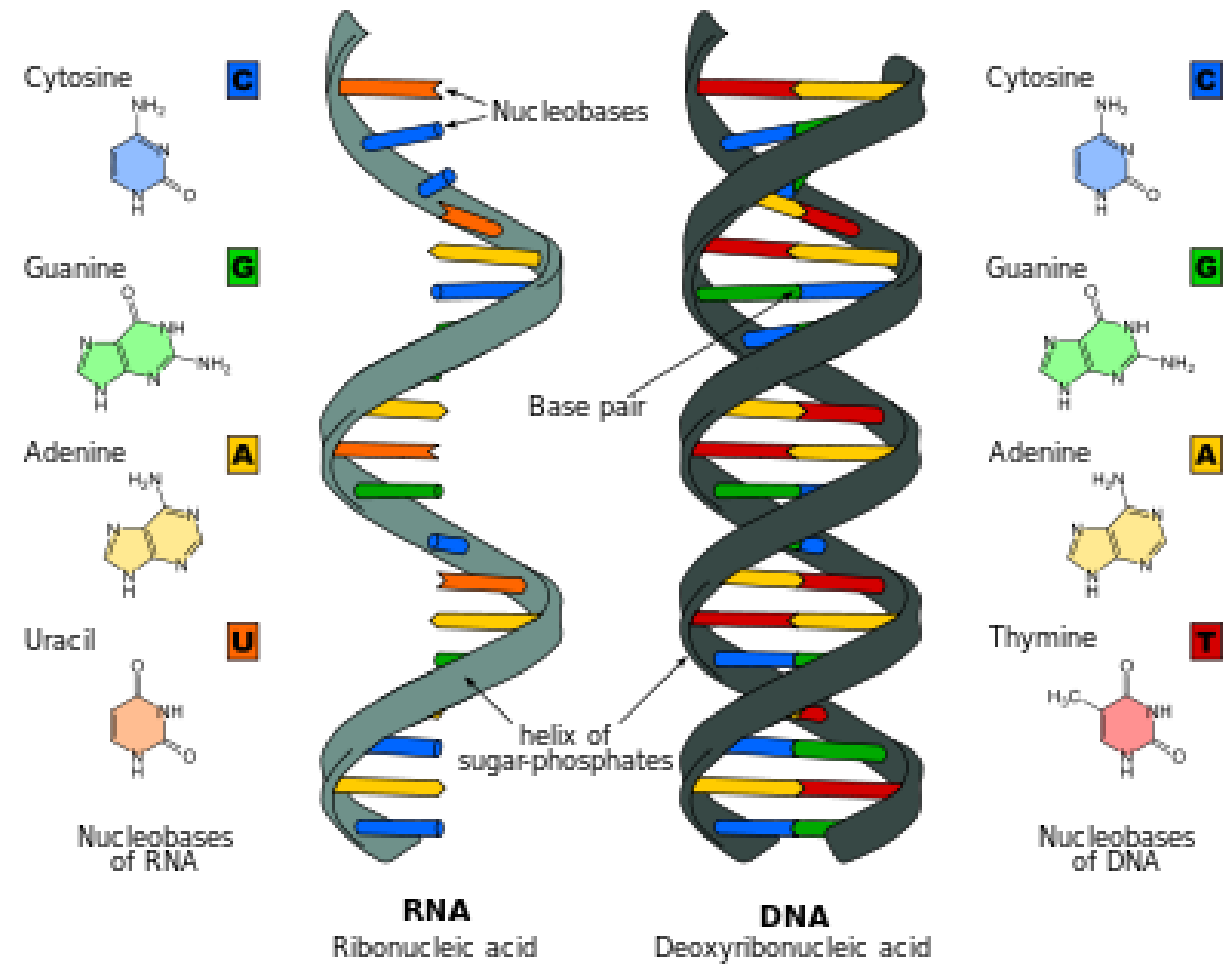
Ελένη Κουρέα
Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Πατρών

Εισαγωγή

- Η φυσιολογική ή παθολογική **κατάσταση των κυττάρων** ξεκινά από και **αντανακλά μοριακές αλλαγές**, ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας που αφορούν στα γονίδια, τη ρύθμισή τους ή τις πρωτεΐνες

Εισαγωγή

- **Αλληλούχιση** (sequencing) του ανθρώπινου γονιδιώματος
 - = ανάλυση, καταγραφή της σειράς των νουκλεοτιδίων των γονιδίων...
- “The **human genome project**” 1990-2003
<https://www.genome.gov/human-genome-project>
- Τεράστιο **κόστος αλληλούχισης** αρχικά, το οποίο προοδευτικά μειώνεται και η αλληλούχιση γίνεται ευκολότερα προσιτή
- Τεράστια παραγωγή **βιοπληροφορίας**, η οποία πρέπει να καταστεί διαχειρίσιμη και να αξιολογηθεί



Εισαγωγή

- Εκτός της **αλλουλουχίας των γονιδίων**, άλλα κυτταρικά γεγονότα έχουν σημασία για τη λειτουργία τους
- Ο **έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων** π.χ. σίγαση μέσω διεργασιών όπως η μεθυλίωση, ακετυλίωση των εκκινητών (επιγενετική – epigenomics) και η μεταγραφική δραστηριότητα (transcriptomics)
- Η πρωτεϊνική σύσταση των κυττάρων (proteomics)
- Το μεταβολικό προφίλ (metabolomics)

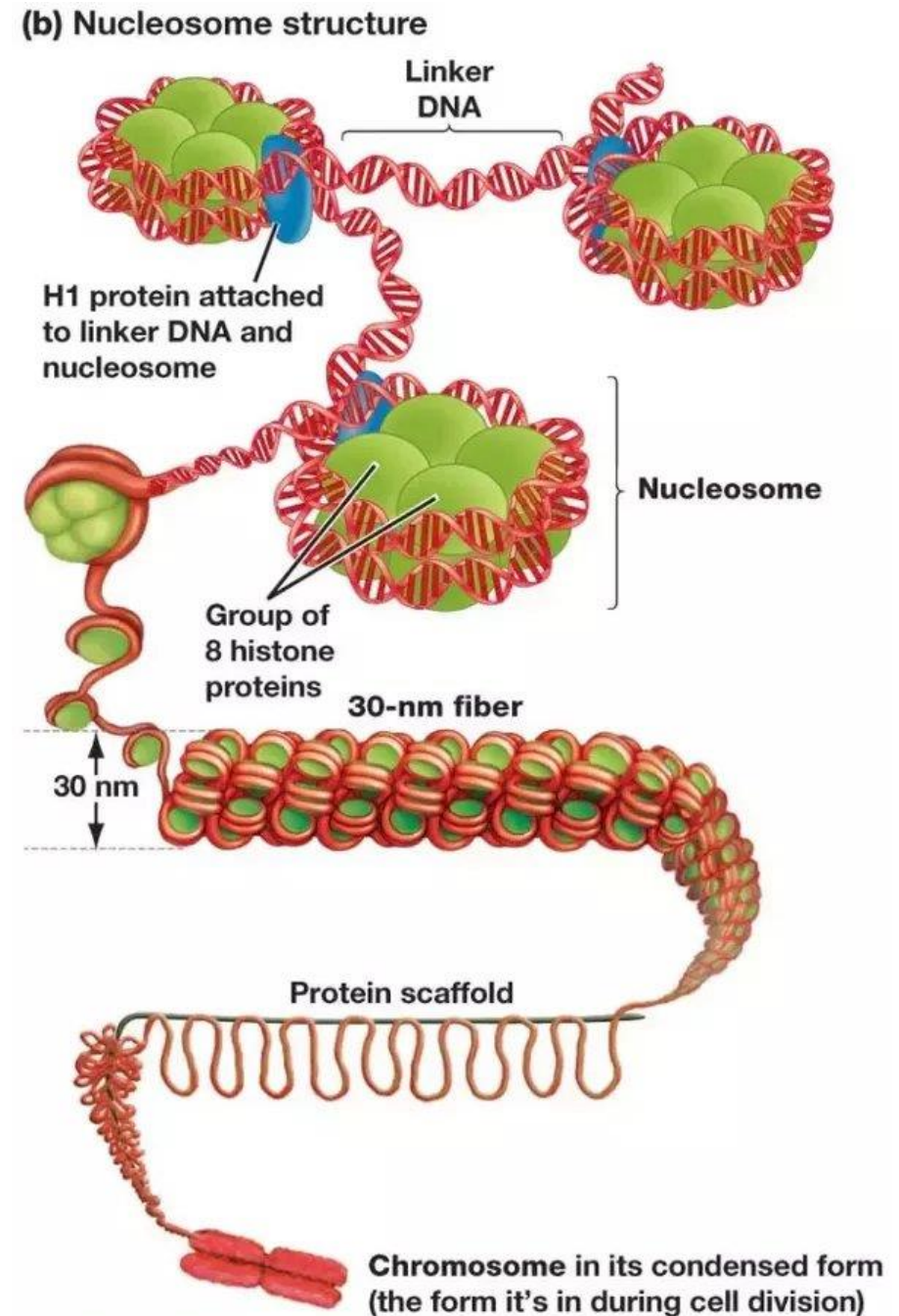
- Εποχή των –omics και της βιοπληροφορικής
- Systems Biology (Biology and Informatics)

Γονιδίωμα

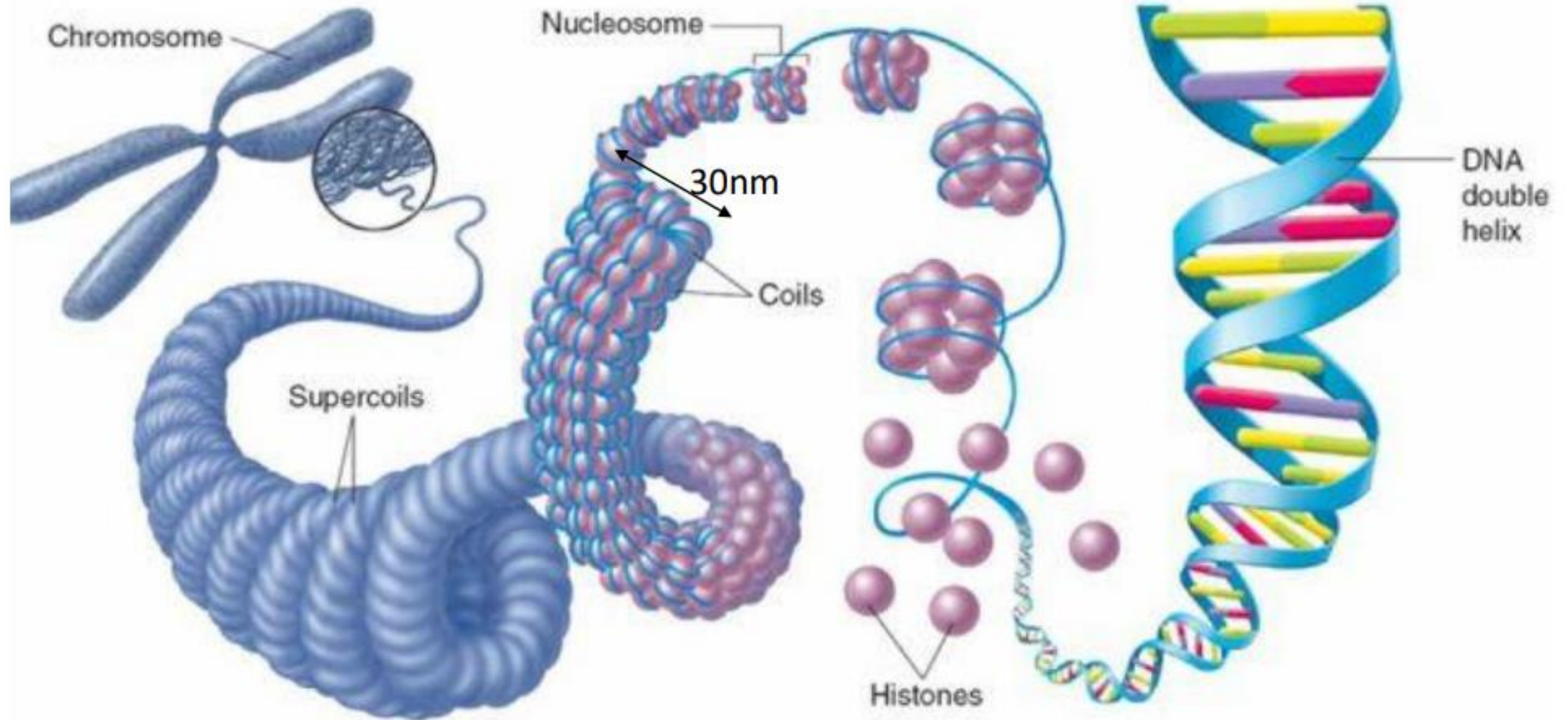
- Ανθρώπινο DNA: 3,2 δισ. Ζεύγη βάσεων (base pairs – bp)
- Το 1,5% αυτού κωδικοποιεί **20.000 γονίδια** (coding DNA) για δομικές ή λειτουργικές πρωτεΐνες
- ~85% μεταγράφεται, ~80% της μεταγραφής αφορά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

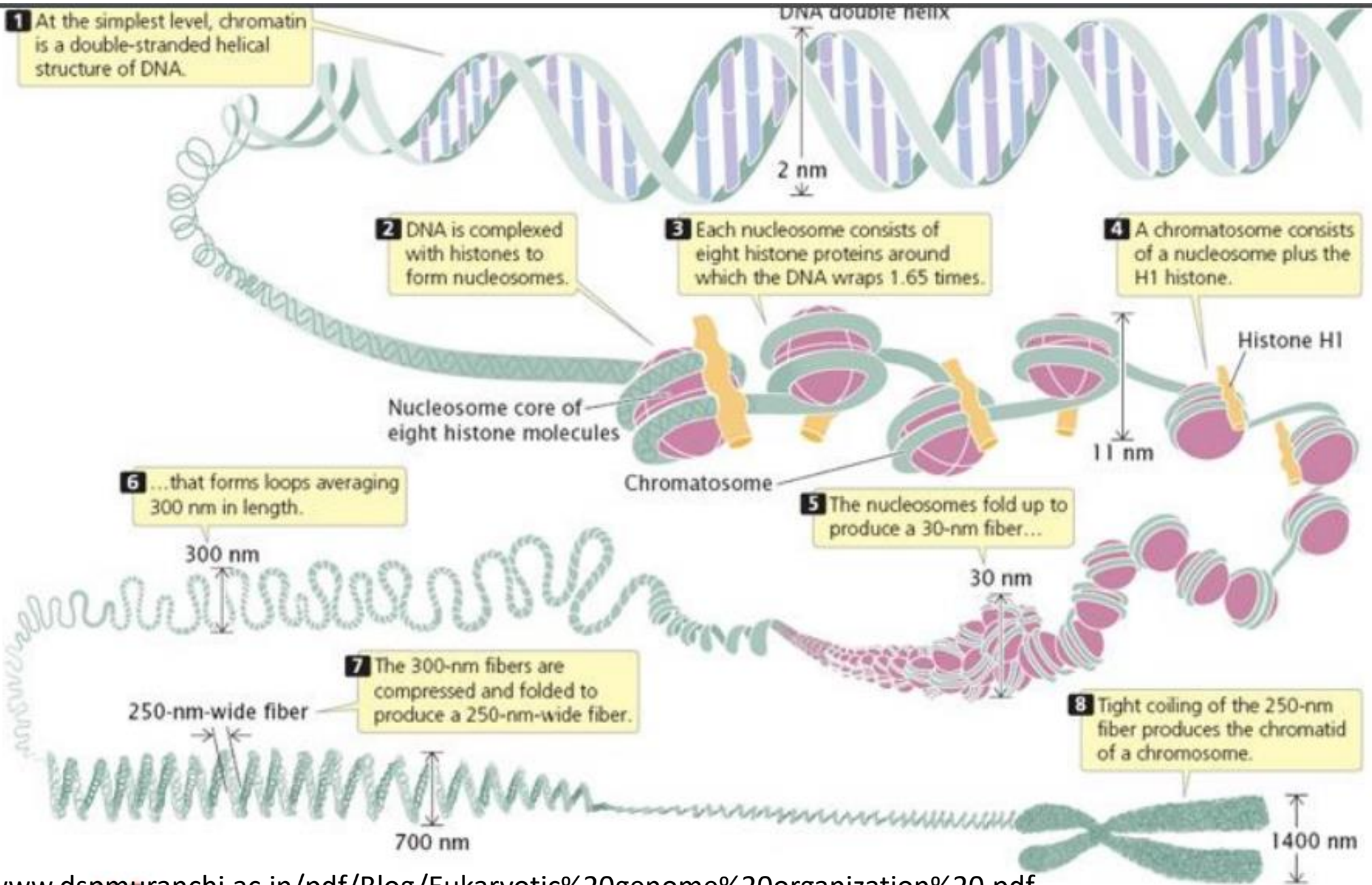
Οργάνωση γονιδιώματος

- Το DNA τυλίγεται γύρω από 8 ιστόνες πρωτεΐνες (H2A, H2B, H3, H4) και μια εξωτερική ιστόνη H1 και σχηματίζει το νουκλεόσωμα
- Μεταξύ των νουκλεοσωμάτων παρατηρούνται οι συνδέτες DNA (linker DNA)
- Η δομή αυτή περιελίσσεται (σαν ελατήριο) και δημιουργεί «coils» (chromatin fibers= ίνες χρωματίνης), αγκύλες (loops) και supercoils
- Αναλυτικότερα στις επόμενες 3 διαφάνειες

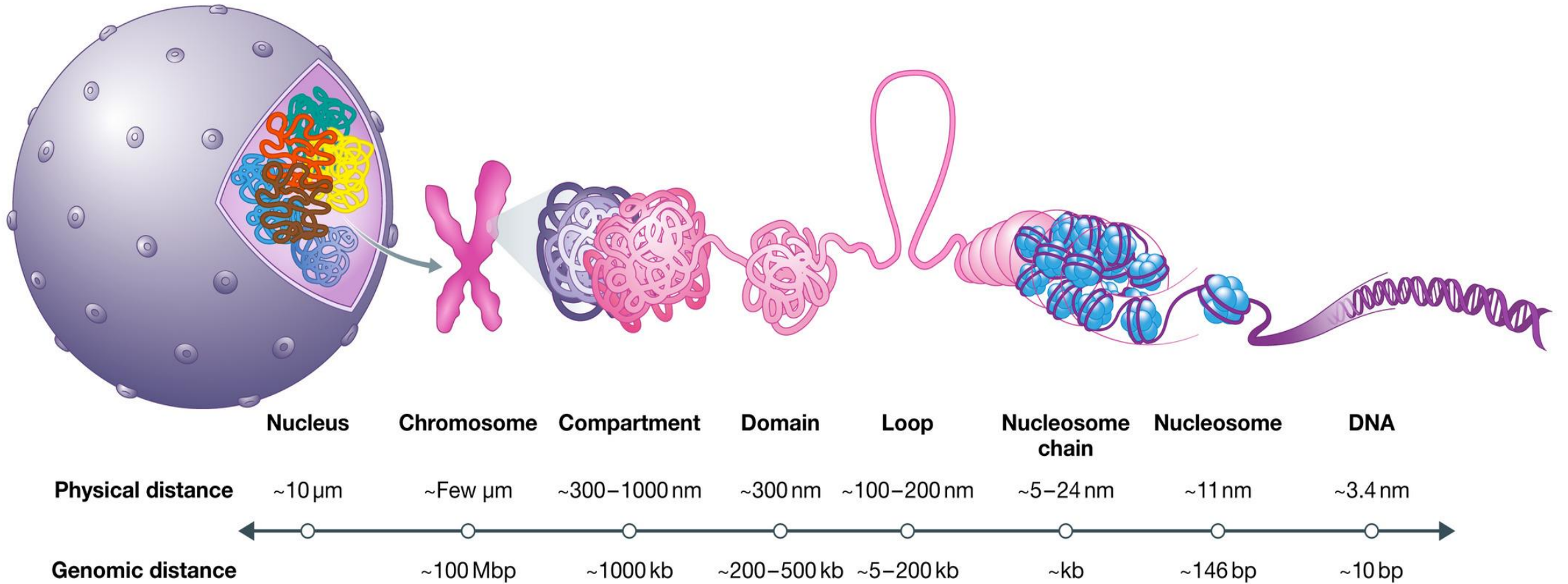


■ Eukaryotic Chromosome Structure





Οργάνωση γονιδιώματος



Γονιδίωμα

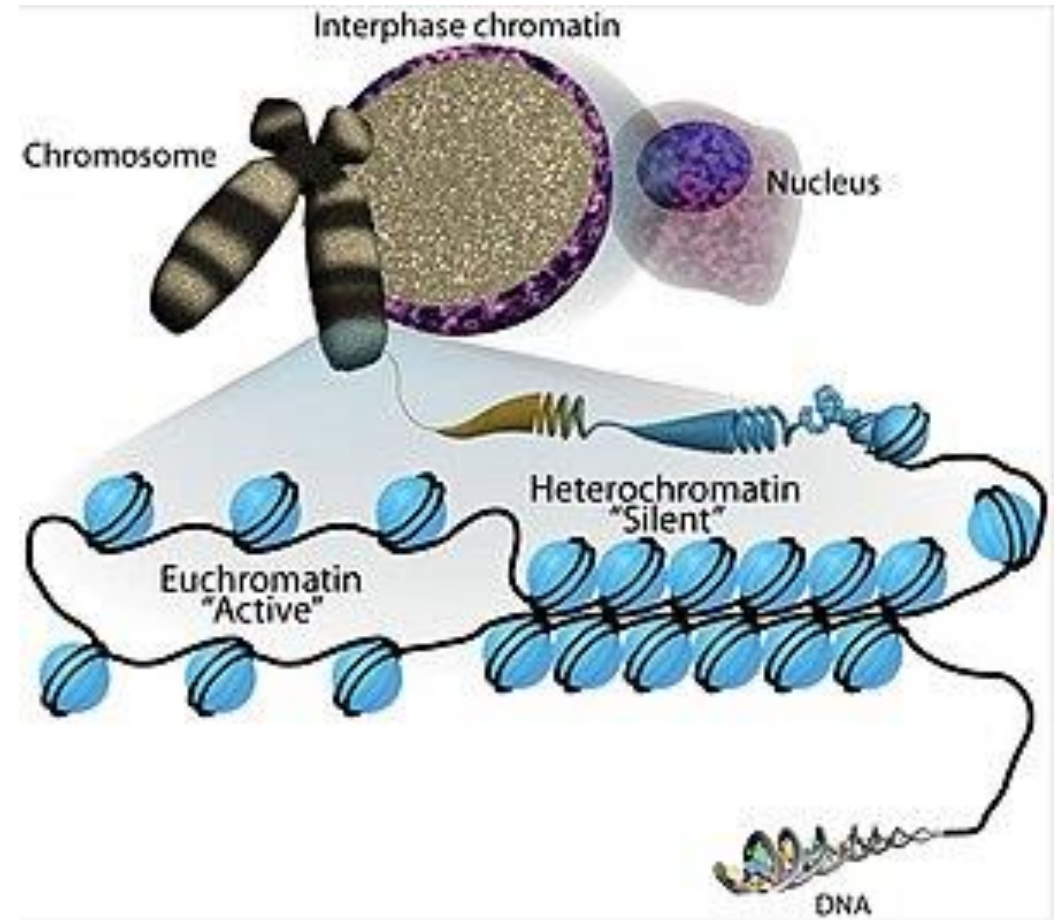
- Το DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες (**non-coding DNA**), ~ 98,5% του γονιδιώματος, περιλαμβάνει:
 - **Υποκινητές** γονιδίων που δεσμεύουν μεταγραφικούς παράγοντες
 - Θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών για διατήρηση **δομής χρωματίνης**
 - Μη κωδικοποιούντα **ρυθμιστικά RNA** (μικρο-RNA (=miRNA) και μεγάλα ρυθμιστικά RNA)
 - Μεταθετά γενετικά στοιχεία (**τρανσποζόνια**) ~1/3 του γονιδιώματος
 - Για γονιδιακή ρύθμιση και οργάνωση χρωματίνης
 - Περιοχές **κεντρομεριδίων** (συνδέτες χρωματίδων)
 - Περιοχές των **τελομερών** (άκρα χρωμοσωμάτων)

Γονιδιακή ρύθμιση

- Αν και όλα τα κύτταρα έχουν το ίδιο DNA, εμφανίζουν διαφορετική δομή και λειτουργία λόγω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης
- που συντελείται κυρίως
- Α. με **επιγενετικές τροποποιήσεις**
 - και κατευθύνει τις περιοχές του γονιδιώματος που διαμορφώνονται ως ευχρωματίνη ή ετεροχρωματίνη
- Β. Μικρο-RNA και μεγάλο μη κωδικοποιό RNA

Οργάνωση γονιδιώματος

- DNA που **μεταγράφεται: ευχρωματίνη** (ανοιχτή (ξεδιπλωμένη) χρωματίνη σχετίζεται συνήθως με **ακετυλίωση μέσω ακετυλο-τρανσφερασών**
 - Οι αποακετυλάσες (histone deacetylase, HDAC) οδηγούν σε πύκνωση της χρωματίνης
- DNA που δεν μεταγράφεται: **ετεροχρωματίνη** (πυκνά διπλωμένη, **σιωπηρή**) χρωματίνη σχετίζεται συνήθως με **μεθυλίωση**
- Αντιδράσεις **μεθυλίωσης και ακετυλίωσης** είναι πολύ σημαντικές στην **επιγενετική γονιδιακή ρύθμιση**
 - Αναστολείς HDAC και αναστολείς μεθυλίωσης χρησιμοποιούνται στη θεραπεία τύπων καρκίνου



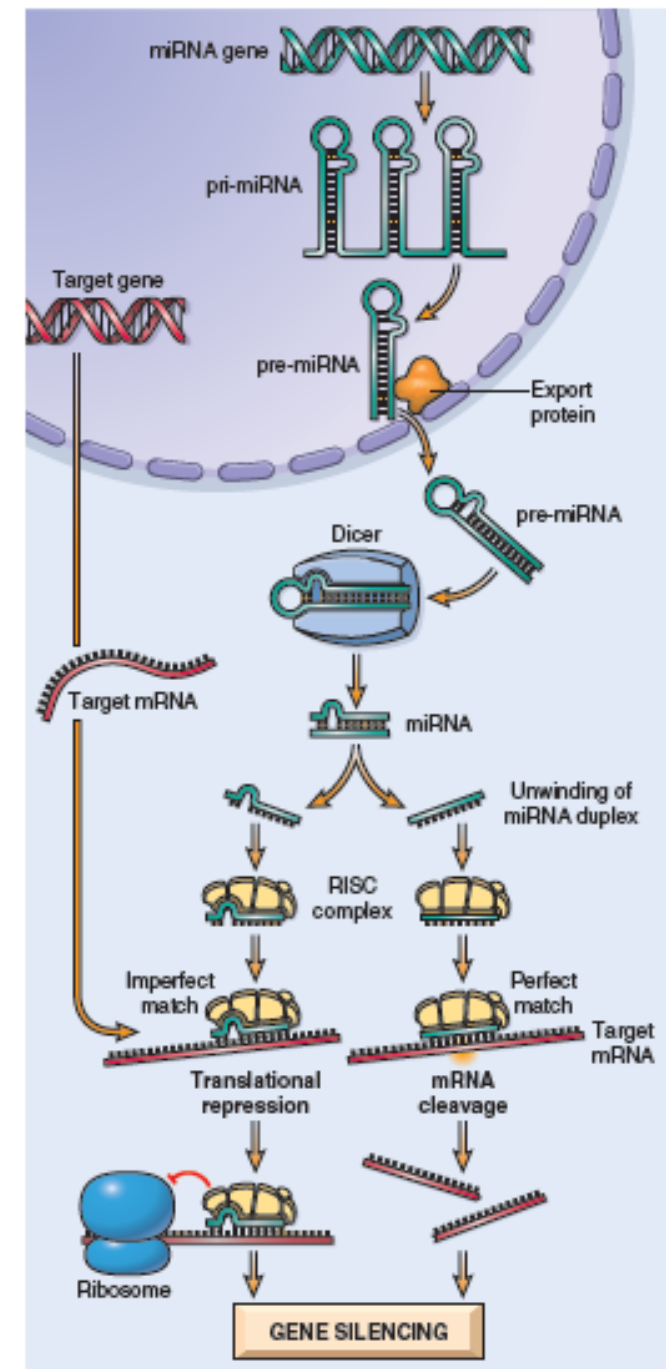
Γονιδιακή ρύθμιση: Α. επιγενετικές τροποποιήσεις

- Μηχανισμοί:
 - **Μεθυλίωση DNA:** υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων οδηγούν σε πύκνωση της χρωματίνης και μεταγραφική σίγαση
 - **Παράγοντες τροποποίησης των ιστονών:**
 - τα νουκλεοσώματα είναι δυναμικές δομές που ρυθμίζονται από πυρηνικές πρωτεΐνες και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
 - συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης: μεταθέτουν νουκλεοσώματα και εκθέτουν ή αποκρύπτουν ρυθμιστικά στοιχεία

Γονιδιακή ρύθμιση:

B. Μικρο-RNA

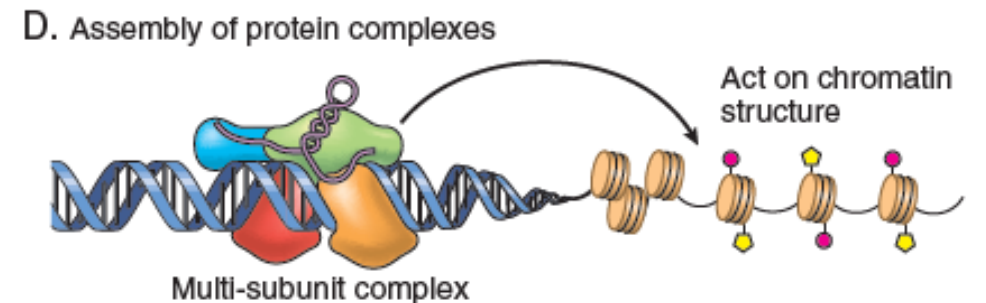
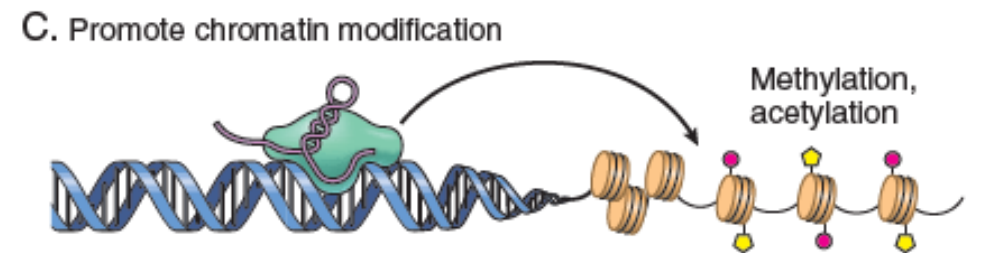
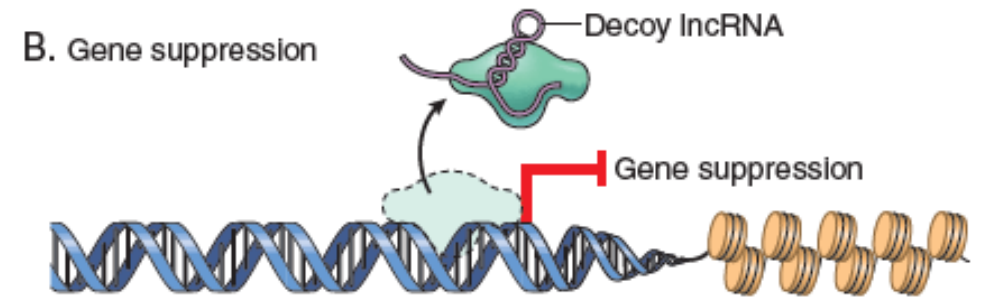
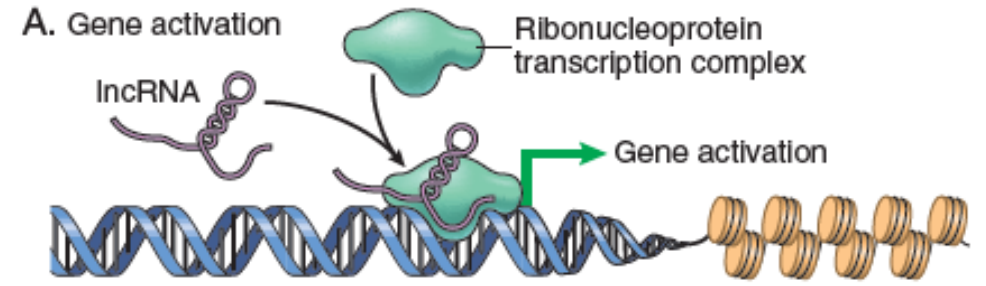
- **Μη κωδικοποιό RNA:** από γονίδια που μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται
 - **A. μικρο-RNA (miRNA):**
 - ~6000 γονίδια κωδικοποιούν miRNA
 - Από ~22 νουκλεοτίδια,
 - ρυθμίζουν τη μετάφραση των mRNA στόχων, συνδεόμενα με το mRNA στόχο και μπλοκάροντας τη μετάφρασή του
 - **Μετα-μεταγραφική σίγαση** διατηρημένος μηχανισμός γονιδιακής σίγασης σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς



Γονιδιακή ρύθμιση:

B. μεγάλο μη κωδικοποιό RNA

- **Μη κωδικοποιό RNA:** από γονίδια που μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται
 - B. μεγάλα μη κωδικοποιούντα RNA (**l**ong **n**on**c**oding **R**NA- *lncRNA*)
 - >200 νουκλεοτίδια
 - ~30.000 *lncRNA*
 - Ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση
 - A. Διευκολύνουν δέσμευση μεταγραφικών και αυξάνουν τη μεταγραφή
 - B. Δεσμεύουν ρυθμιστικούς παράγοντες και τους; Οδηγούν σε καταστροφή
 - C. Επηρεάζουν τροποποιήσεις της χρωματίνης (ακετυλίωση μεθυλίωση)
 - D. Διαμόρφωση συμπλεγμάτωνΜε δέσμευση στη χρωματίνη και παρεμπόδιση της RNA πολυμεράσης



Πολυμορφισμοί

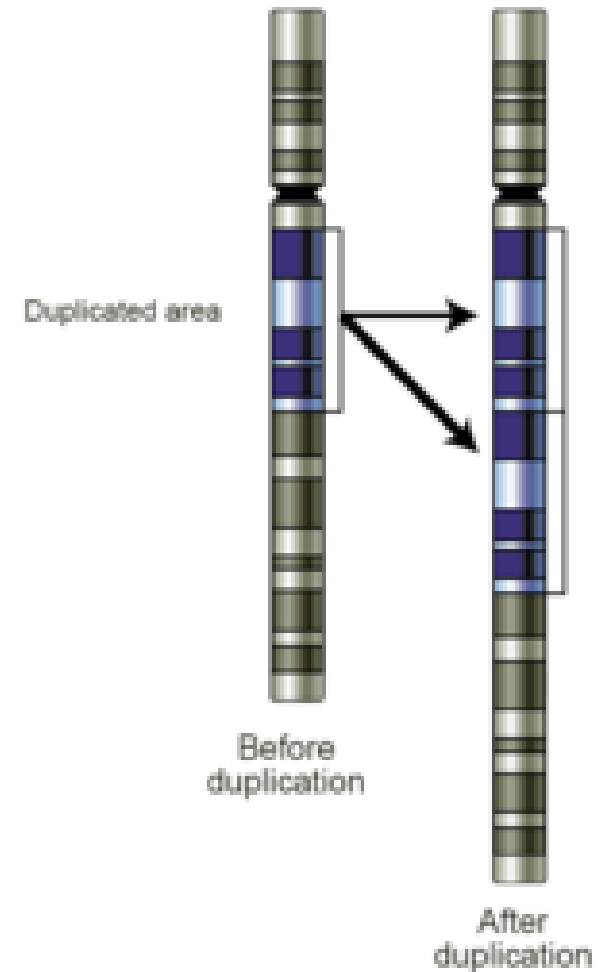
- Παραλλαγές του γονιδιώματος
 - Σε περιοχές coding και non-coding DNA
 - σχετίζονται συχνά με διάφορες νόσους
 - Τόσο η δομή όσο και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι σημαντικές για την πρόκληση νόσου
- Οι άνθρωποι μεταξύ τους έχουν ταυτόσημη αλληλουχία DNA κατά >99,5%
!!!
- Και με τους χιμπατζήδες ταυτόσημη αλληλουχία κατά 99%!!!
- Το 0,5% του DNA μας(=15.000.000 bp) ενέχεται για τις διαφορές στην ευαισθησία για νόσο
- **Οι δυο συχνότερες παραλλαγές:**
 - Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)
 - Παραλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (Copy Number Variations – CNVs)

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)

- Το 1% αυτών σε περιοχές κωδικοποίησης
- Μπορεί να εμφανίζονται σε ρυθμιστικές περιοχές, οπότε επηρεάζουν την ευαισθησία στη νόσο
- Μπορεί να είναι «ουδέτερες», δηλαδή χωρίς επίδραση στη λειτουργία ή στο φαινότυπο
 - Αλλά μπορεί να συγκληρονομούνται με γονίδια που σχετίζονται με νόσο λόγω χωρικής εγγύτητας με το σχετικό με τη νόσο γονίδιο, οπότε ο SNP και το παθολόγο γονίδιο βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης
- Η επίδραση των SNPs στην επιρρέπεια για νόσο είναι ασθενής

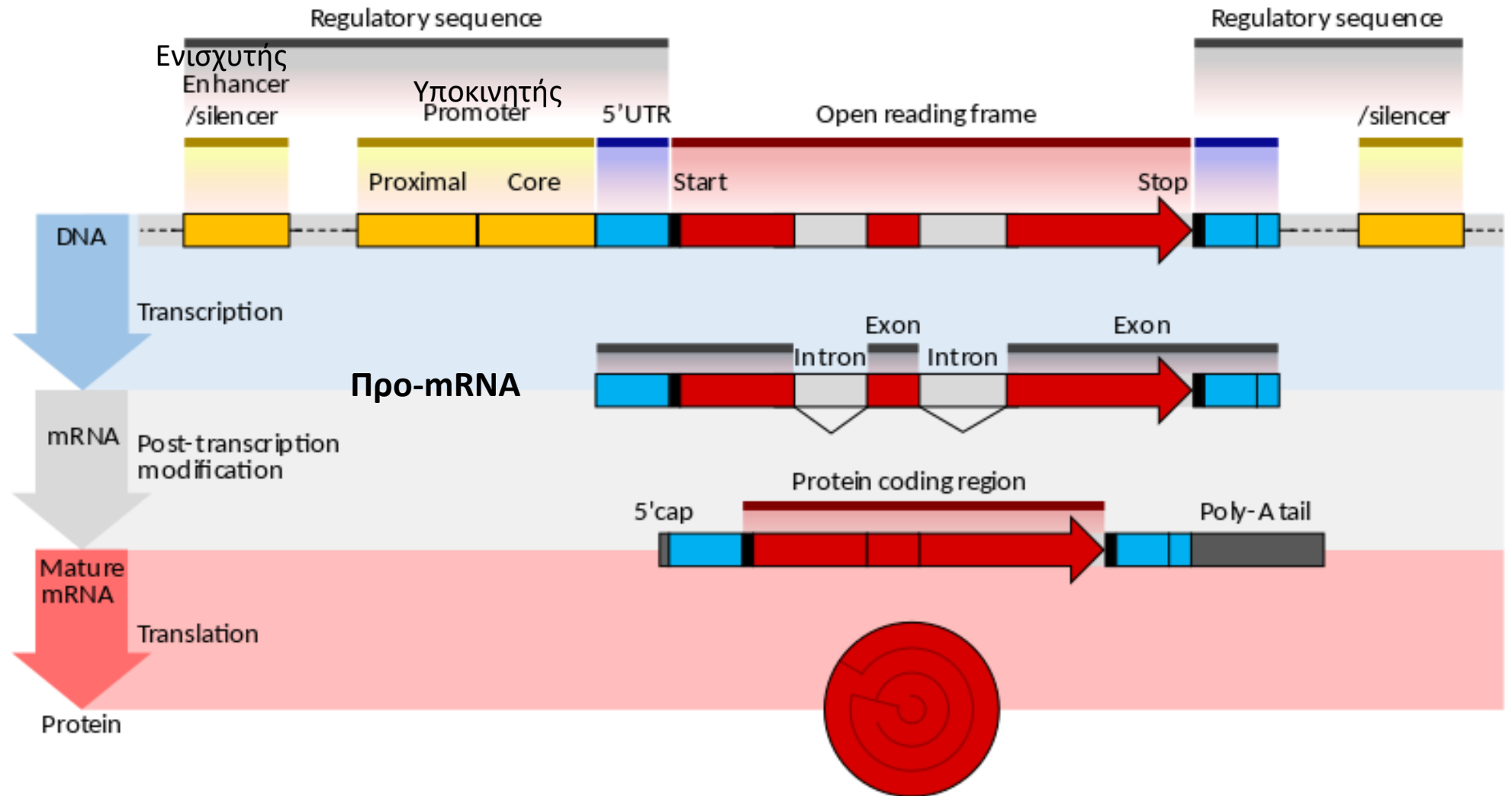
Παραλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (Copy Number Variations – CNVs)

- Γενετική παραλλαγή που αφορά σε τμήματα του γονιδιώματος (2-3 ή 1000-εκατομμύρια bp), που επαναλαμβάνονται και ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλλει μεταξύ των ατόμων
- Μπορεί να είναι διπλασιασμός ή απαλοιφή
- Βραχείες επαναλήψεις π.χ. το τρινουκλεοτίδιο CAG επαναλαμβάνεται 36 φορές στη νόσο Huntington
- Μακρές επαναλήψεις π.χ. ολόκληρα γονίδια και συμβάλλουν στην πολυμορφία του φαινότυπου του ανθρώπου



This [gene duplication](https://en.wikipedia.org/wiki/Copy_number_variation) has created a copy number variation. The chromosome now has two copies of this section of DNA, rather than one.
https://en.wikipedia.org/wiki/Copy_number_variation

Coding DNA - Γονίδιο

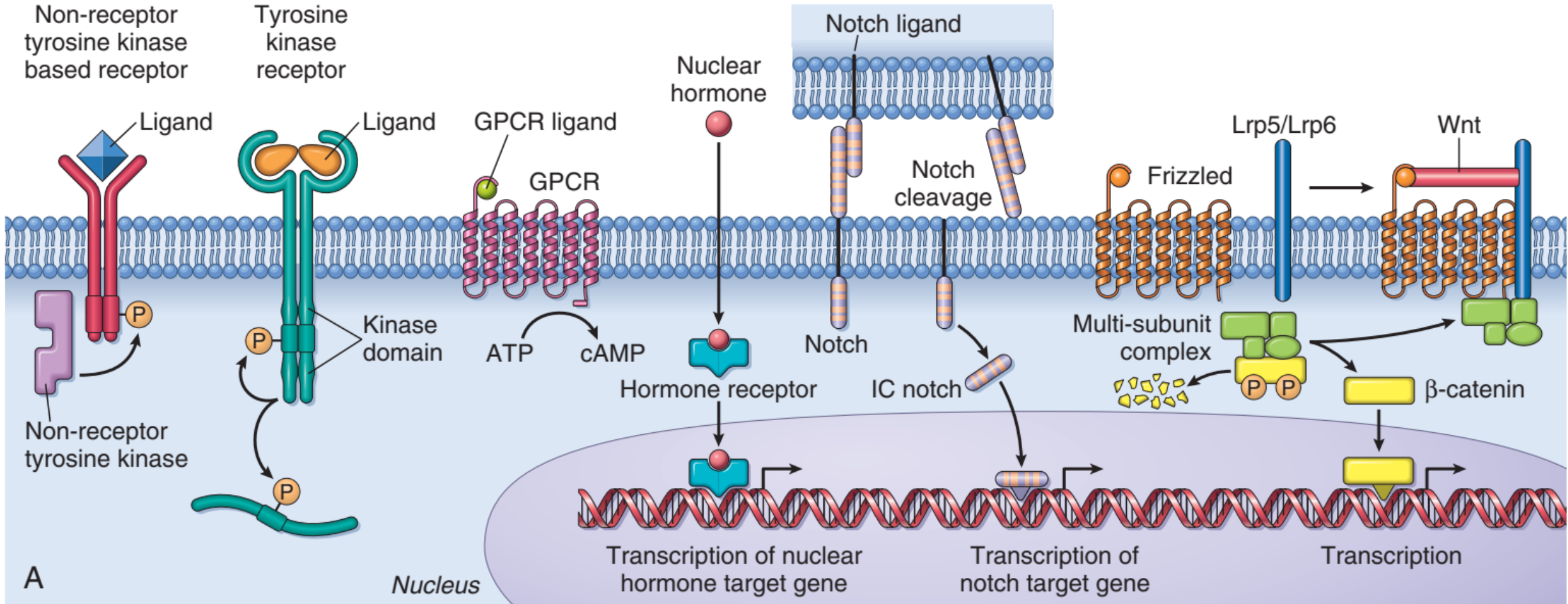


Κυτταρική σηματοδότηση

- Με βάση την προέλευση και το στόχο του **σήματος/ερεθίσματος**:
 1. Αυτοκρινής
 2. παρακρινής (δράση στα γειτονικά κύτταρα από τη θέση παραγωγής)
 3. Ενδοκρινής
 4. μέσω σύναψης
- **Υποδοχείς**
 1. Ενδοκυττάρια ενεργοποιούνται από λιποδιαλυτούς συνδέτες (π.χ. βιτ. D, στεροειδείς ορμόνες)
 2. **Υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης**
 - a. Δράση σε διαύλους ιόντων
 - b. Ενεργοποίηση μιας G-πρωτεΐνης (ρυθμιστική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με GTP)
 - c. **Ενεργοποίηση ενζύμου π.χ. κινάση τυροσίνης**
 - d. Πυροδότηση πρωτεολυτικής αντίδρασης ή ενεργοποίηση μεταγραφικού παράγοντα
- Το αποτέλεσμα είναι η **ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος**:
 - Δημιουργία ή τροποποίηση **ενδιάμεσων προϊόντων** ή ενεργοποίηση ενζύμων με τελική **παραγωγή ενεργοποιημένων μεταγραφικών παραγόντων** που **τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση** (αποδιοργανωμένη στον καρκίνο)

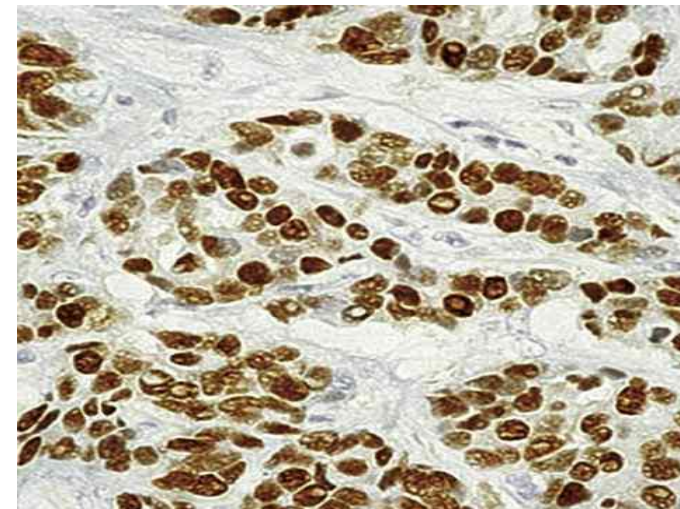
Υποδοχείς μεταγωγής σήματος

Signal transduction pathways

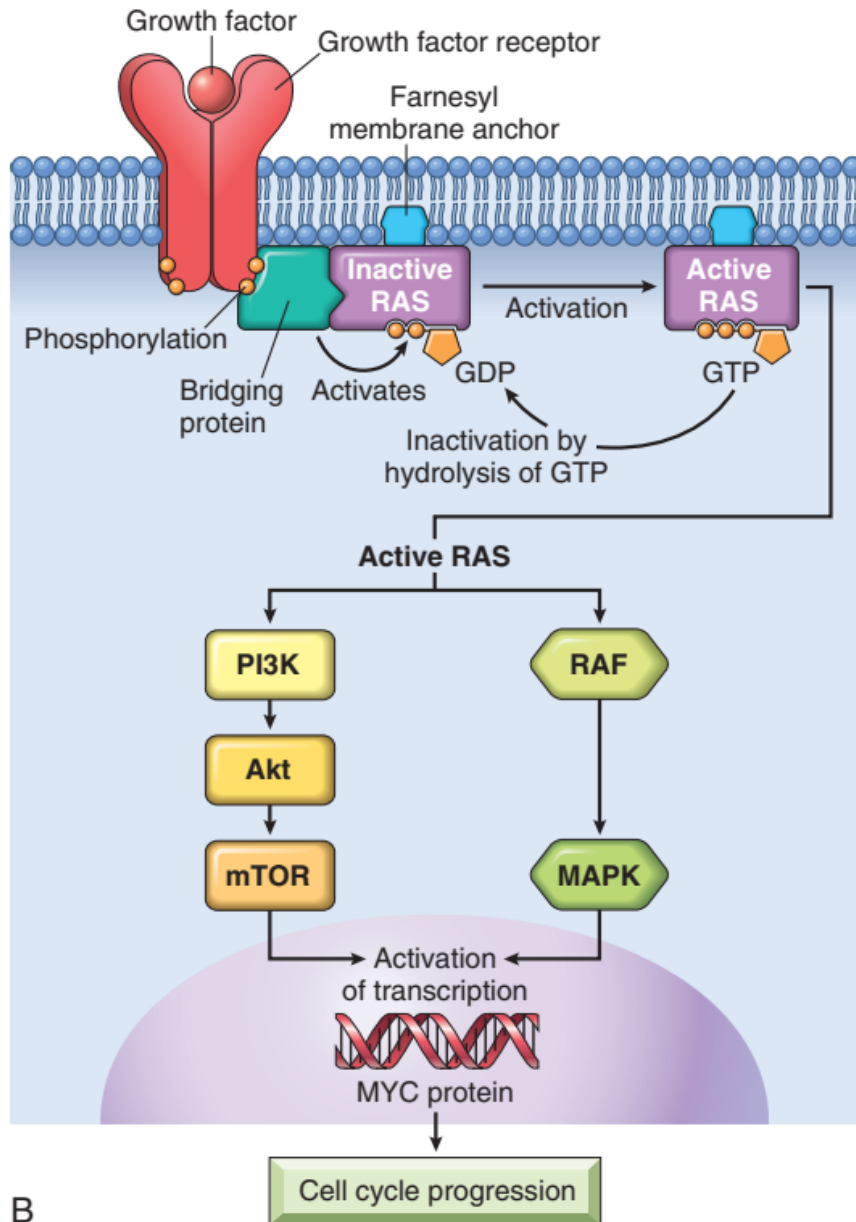


Υποδοχείς οιστρογόνων (ER)

- Οιστρογόνα: παράδειγμα ορμόνης που δρα στον πυρήνα
- ER: μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από οιστρογόνα και προάγει τον πολ/σμό φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων μαστού.
- Οι ER εντοπίζονται στους πυρήνες (καφέ χρώση στην διπλανή εικόνα) και εκφράζονται σε ~80% των **ca μαστού**
- Η **θετικότητα για ER προβλέπει ανταπόκριση σε αντιοιστρογονικές θεραπείες** (π.χ. ταμοξιφαίνη και αναστολείς αρωματάσης, αναλογικά με το ποσό της έκφρασης) και σχετίζεται **με καλύτερη πρόγνωση**



Σηματοδότηση υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης



signaling. **B**, Signaling from a tyrosine kinase-based receptor. Binding of the growth factor (ligand) causes receptor dimerization and autophosphorylation of tyrosine residues. Attachment of adapter (or bridging) proteins couples the receptor to inactive, GDP-bound RAS, allowing the GDP to be displaced in favor of GTP and yielding activated RAS. Activated RAS interacts with and activates RAF (also known as *MAP kinase kinase kinase*). This kinase then phosphorylates MAPK (mitogen-activated protein kinase) and activated MAP kinase phosphorylates other cytoplasmic proteins and nuclear transcription factors, generating cellular responses. The phosphorylated tyrosine kinase receptor can also bind other components, such as phosphatidylyl 3-kinase (PI3 kinase), which activates other signaling systems. The cascade is turned off when the activated RAS eventually hydrolyzes GTP to GDP converting RAS to its inactive form. Mutations in RAS that lead to delayed GTP hydrolysis can thus lead to augmented proliferative signaling. GDP, Guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; mTOR, mammalian target of rapamycin.

Κυτταρική σηματοδότηση

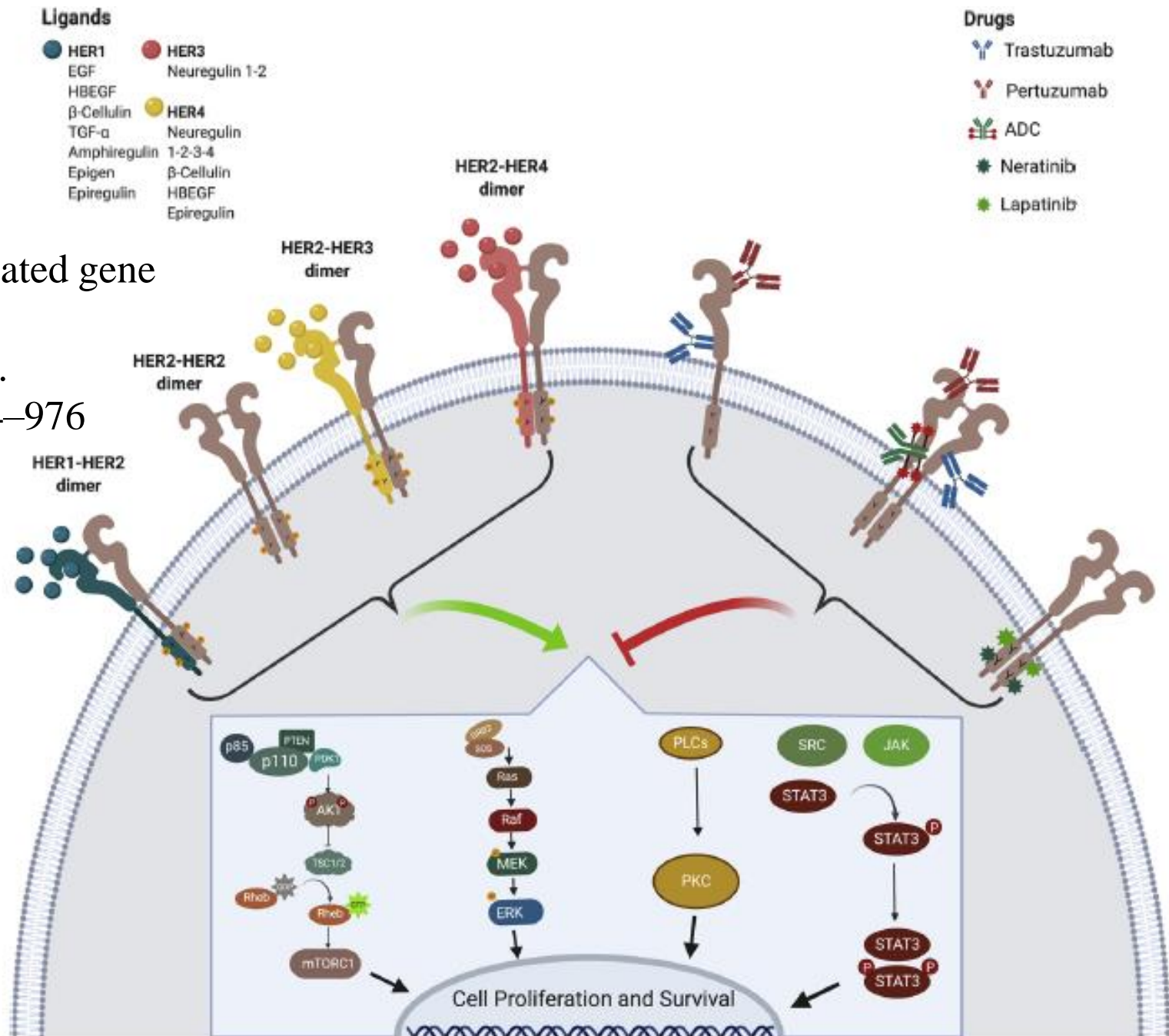
- Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών δεν είναι γραμμική αλλά λειτουργεί σε πολύπλοκα δίκτυα με πολλαπλές αλληλεπιδράσεις
- Οι αυξητικοί παράγοντες είναι ουσίες που διεγείρουν λειτουργίες ανάπτυξης, διαίρεσης και επιβίωσης του κυττάρου με πρόσδεση τους στους κατάλληλους κυτταρικούς υποδοχείς
- Π.χ. μέλη της οικογένειας **EGF** (Epidermal Growth Factor), που παράγονται από μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα, συνδέονται με αντίστοιχους υποδοχείς EGF (EGF Receptor = **EGFR**)
 - Η οικογένεια EGFR έχει 4 μέλη (EGFR1= EGFR=ERBB1, ERBB2=HER2, EGFR3, EGFR4)
 - **Μεταλλάξεις του EGFR** είναι σημαντικότερο μοριακό γεγονός στον **καρκίνο του πνεύμονα** και **θεραπευτικός στόχος** για στοχεύουσες θεραπείες
 - **Ενίσχυση του γονιδίου ERBB2 (=HER2)** είναι σημαντικότερο μοριακό γεγονός στον **καρκίνο του μαστού** και **θεραπευτικός στόχος** για στοχεύουσες θεραπείες

HER2 pathway

Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma.

King CR, Kraus MH, Aaronson SA.

Science. 1985 Sep 6;229(4717):974–976



Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S et al. Addition of Herceptin® (humanized anti HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial. Proc Am Soc Clin Oncol 1998;17:98a.

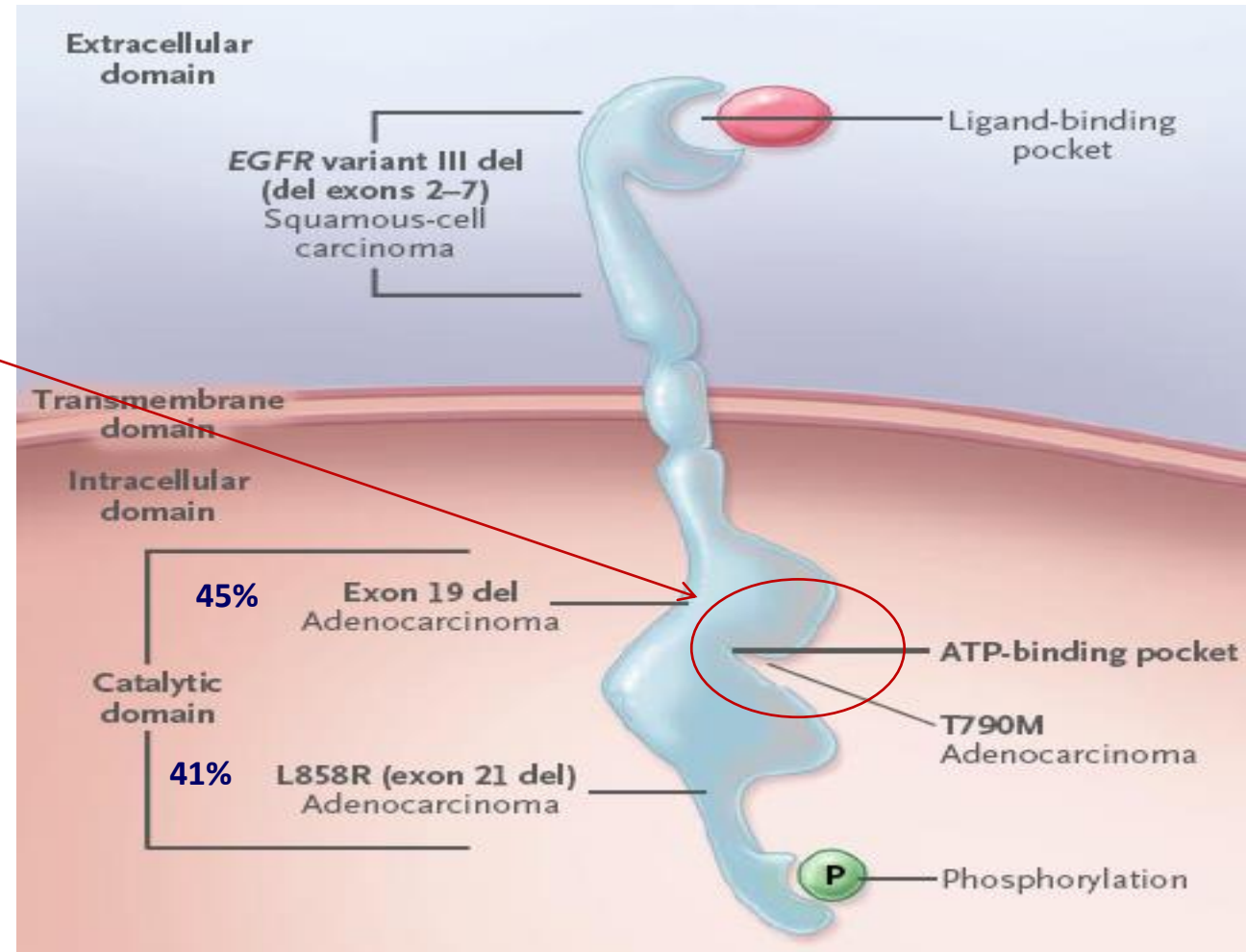


Herceptin: FDA approval in 1998 for metastatic breast cancer (mBC) with Hercept test as companion diagnostic: circumferential intense staining in >10% of the tumor cells

In 2000 EMA approval of Herceptin for mBC

Μεταλλάξεις EGFR σε αδеноκαρκίνωμα (ACA) πνεύμονα

- Σε ~25-30% των ACA
- Στα εξόνια 19 και 21 (80-90%)
- **Gefitinib, erlotinib:** EGFR TKIs (tyrosine kinase inhibitors) (στη θέση κινάσης τυροσίνης)
 - 10% ανταπόκριση σε μη επιλεγμένους ασθενείς
 - **75-80% ανταπόκριση σε μεταλλάξεις EGFR (TK)**
- Σχετίζονται με
 - Ανταπόκριση στους EGFR TKIs και ακολούθως καλύτερη πρόγνωση

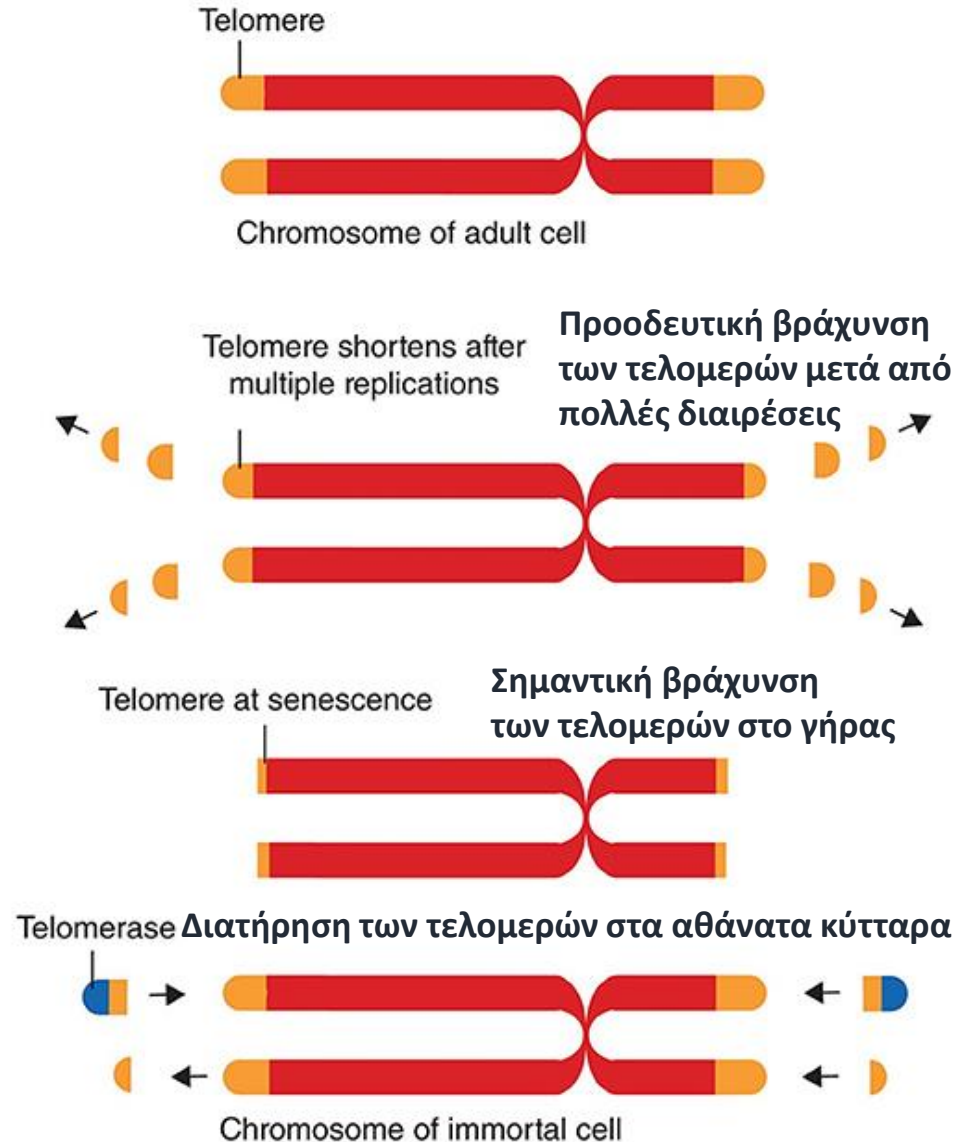
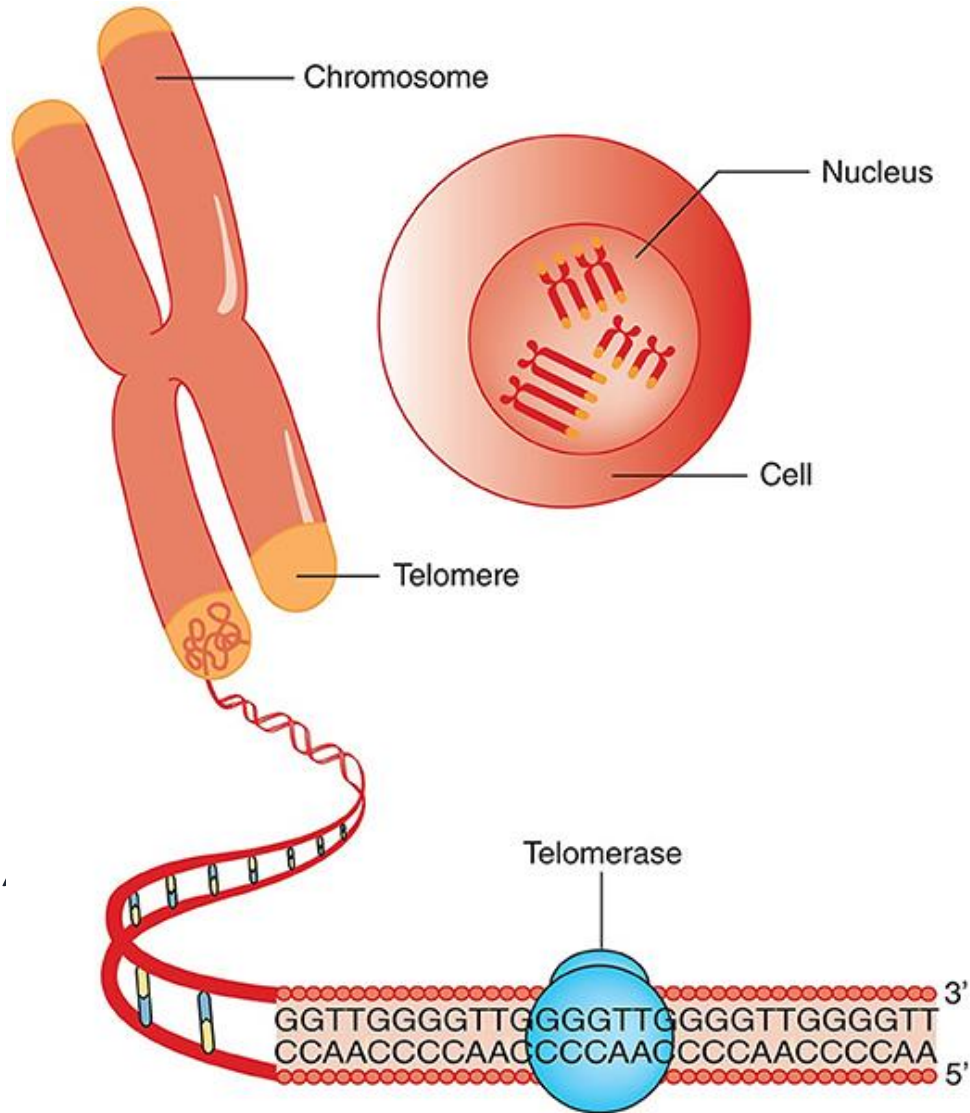


Τελομερή

- Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων συνδυασμένων με πρωτεΐνες στα άκρα των χρωματίδων
- επιτρέπουν τον επαναλαμβανόμενο αναδιπλασιασμό των χρωμοσωμάτων χωρίς απώλεια σημαντικού χρήσιμου γενετικού υλικού
 - Σε κάθε σωματική διαίρεση τα τελομερή βραχύνονται κατά 50–200 bp λόγω ατελούς σύνθεσης του τέλους της αλυσίδας κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA. Αυτό οφείλεται στην αδυναμία της DNA πολυμεράσης να αναδιπλασιάσει πλήρως το 3' άκρο της αλυσίδας του DNA (a phenomenon commonly referred to as "the end-replication problem") ([Watson, 1972](#); [Olovnikov, 1973](#))
- Αποτρέπουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου από το να θεωρήσουν τα άκρα των χρωματίδων σαν «θραύσεις διπλής αλυσού» και να προχωρήσουν σε απρόσφορες «επιδιορθώσεις»
- [1983, Nobel Prize in Physiology or Medicine: Barbara McClintock](#), an American [cytogeneticist](#) and the first woman to receive an unshared [Nobel Prize](#) in Physiology or Medicine, for observing that the chromosomes lacking end parts became "sticky" and hypothesized the existence of a special structure at the chromosome tip that would maintain chromosome stability
- [2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Elizabeth Blackburn, Carol Greider, and Jack Szostak](#), for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the [enzyme telomerase](#)

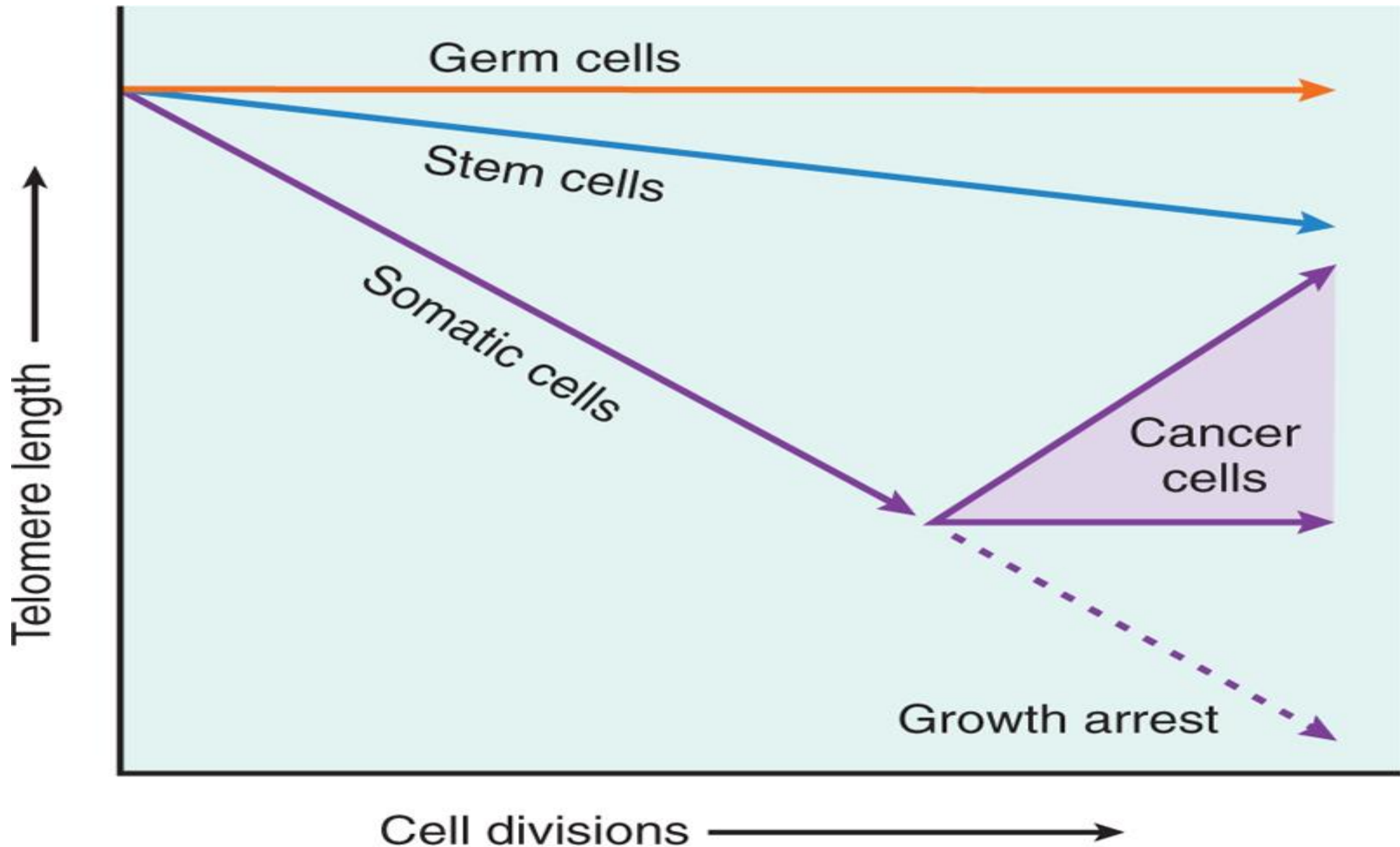
Τελομερή

- **Μετά από πολλές διαιρέσεις:**
Προοδευτική βράχυνση των τελομερών
- **Στο γήρας:**
σημαντική βράχυνση των τελομερών
- **Στα αθάνατα κύτταρα:**
Διατήρηση των τελομερών μέσω της λειτουργίας της τελομεράσης, που αποκαθιστά το μήκος των τελομερών



Τελομερή

- Το μήκος των τελομερών διατηρείται σταθερό με τη δράση του ενζύμου **τελομεράση**,
 - η οποία αποτελεί σύμπλοκο RNA-πρωτεΐνης που χρησιμοποιεί το ίδιο του το RNA σα «μήτρα» για προσθήκη νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων
- Η τελομεράση εκφράζεται στα βλαστικά κύτταρα, σε χαμηλά επίπεδα στα αρχέγονα κύτταρα αλλά όχι στα σωματικά κύτταρα
- **Στα σωματικά κύτταρα** η προοδευτική **απώλεια των τελομερών** θα οδηγήσει στο να ανιχνεύονται τα άκρα των χρωμοσωμάτων ως θραύσεις DNA
- Το γεγονός αυτό θα σηματοδοτήσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου, αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού για παραγωγή νέων κυττάρων που θα αντικαταστήσουν τα κατεστραμμένα και τελικά **γήρανση**
- **Στα καρκινικά κύτταρα** η ενεργοποίηση της λειτουργίας της τελομεράσης θα διασφαλίσει τη δυνατότητα συνεχούς πολ/σμού των καρκινικών κυττάρων

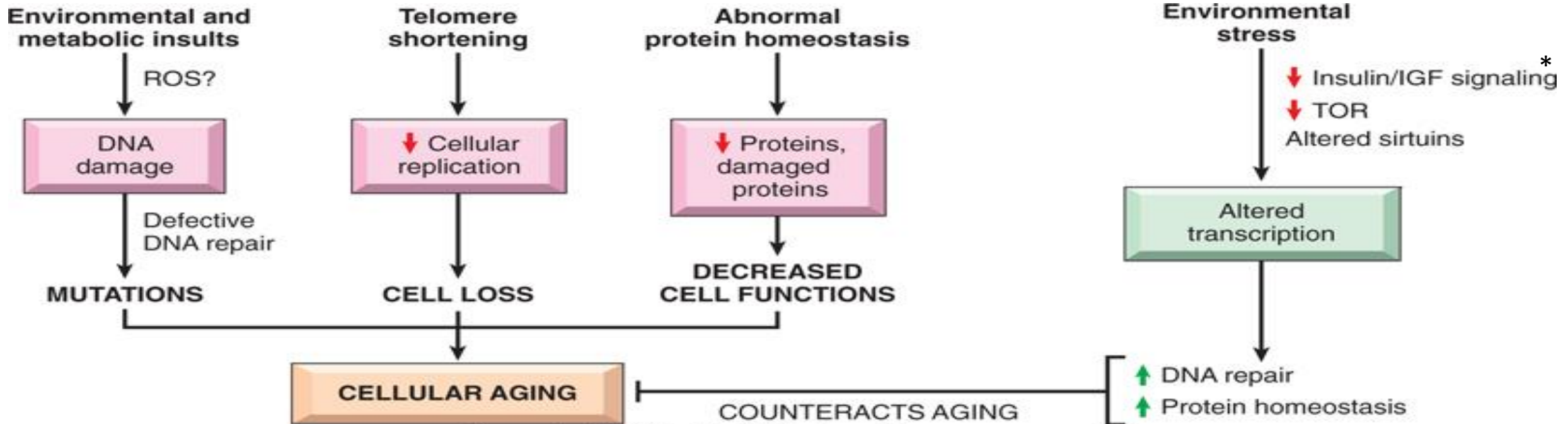


Κυτταρική γήρανση

- Συνεπάγεται γήρανση του οργανισμού
- Σχετικές νόσοι: καρκίνοι, ν. Alzheimer, ισχαιμική καρδιακή νόσος
- Η γήρανση δεν αποτελεί απλώς «εξάντληση» των κυττάρων αλλά μια ρυθμιζόμενη διεργασία από γονίδια και σηματοδοτικές οδούς, εξελικτικά διατηρημένες από τους ζυμομύκητες έως τα θηλαστικά
- **Η κυτταρική γήρανση είναι αποτέλεσμα προοδευτικής μείωσης του χρόνου ζωής και της λειτουργικής δραστηριότητας των κυττάρων**

Κυτταρική γήρανση

- Ο περιορισμός θερμίδων μεταβάλλει τις σηματοδοτικές οδούς* με χαμηλότερους ρυθμούς κυτταρικού πολ/σμού και μεταβολισμού (ίσως μείωση λαθών κατά τον αναδιπλασιασμό και βελτίωση της επισκευής DNA και πρωτεϊνών) και καλύτερη ανοσία



Kumar et al: Robbins Basic Pathology, 9e.
Copyright © 2013 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

Εμμένουσα χρόνια φλεγμονή (λόγω κατεστραμμένων κυττάρων, κτλ) οδηγεί σε εμφάνιση διαβήτη τύπου 2, αθηροσκλήρυνσης