

Μεταπτυχιακό Σεμινάριο ΠΑΘΑΝ

- **ΤΡΟΥΓΚΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ**
Αν. Καθ. Βιοχημείας – Ιατρική ΕΚΠΑ
Εργ. Βιολογικής Χημείας
- Ογκογονίδια και Ογκοκατασταλτικά γονίδια
- Επιδιορθώσεις Βλαβών στο DNA

Καρκινογένεση

- Καρκίνος = γενετική πάθηση και παθολογία του είναι η παθολογία του DNA
- Πολυσταδιακή πολυπαραγοντική διαδικασία
- **Κύριοι εμπλεκόμενοι παράγοντες**
- ενεργοποίηση πρωτο-onc
- απενεργοποίηση αντι-onc
- Επιγενετικές αλλοιώσεις

Γενετική καρκίνου

Γενετική σωματικών κυττάρων που επηρεάζει τις διαδοχικές γενιές κυττάρων σε ένα μόνο άτομο όταν ένα αρχικό κύτταρο γίνει καρκινικό



Μελέτη Καρκινογένεσης

•Ογκογονίδια και αντιογκογονίδια

Τρόποι πρόκλησης βλαβών στο DNA από επίδραση περιβαλλοντικών και ενδογενών παραγόντων

•Μελέτη κυτταρικής αύξησης , ιστικής ανανέωσης και γήρανσης. Πρωτεΐνες ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου.

Μελέτη ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σημάτων

•Επιγενετικές αλλοιώσεις DNA

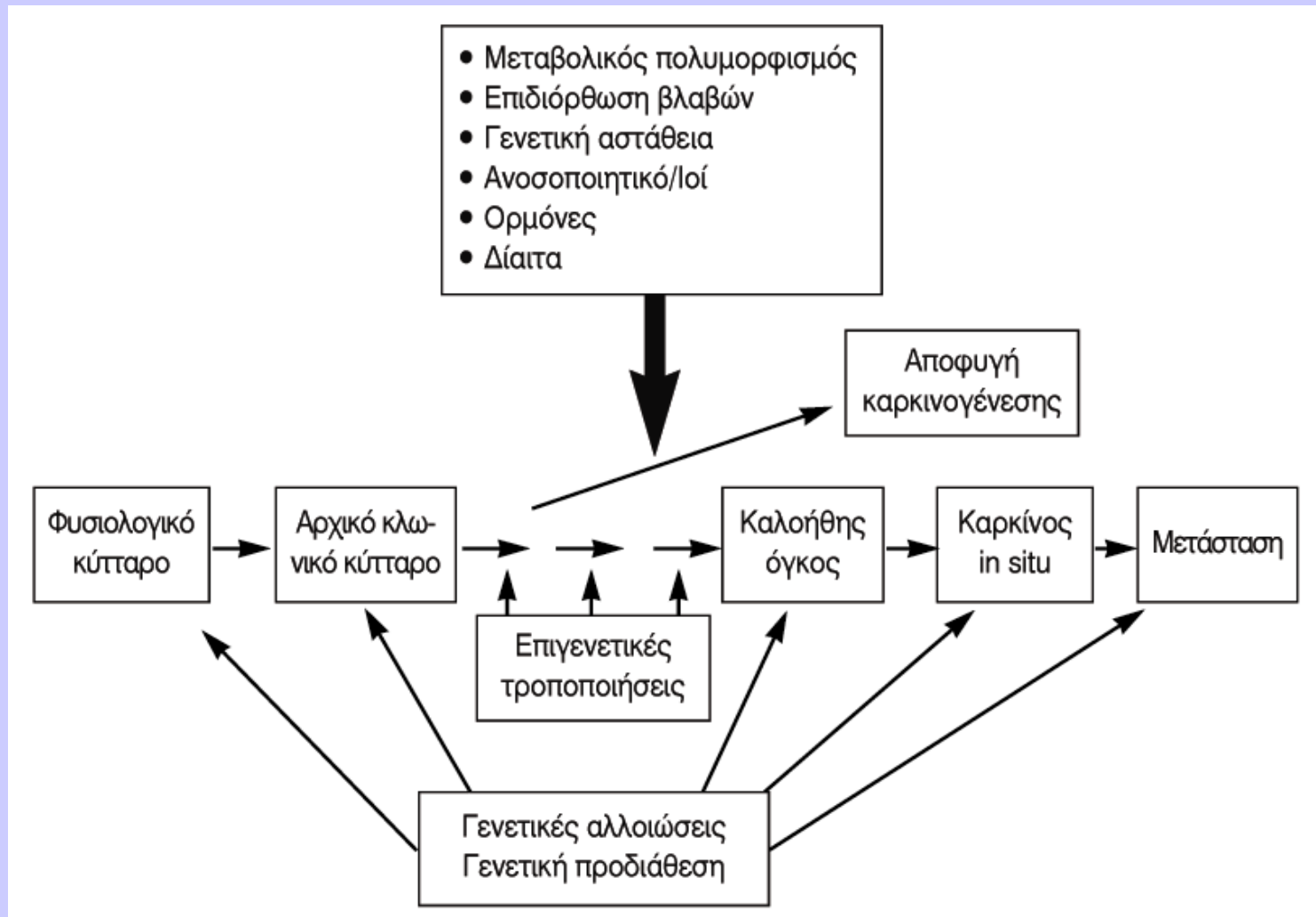
Mutations and Cancer

Genes Implicated in Cancer

<i>The prime suspects</i>	<i>But</i>
Mutations in:	Other mutations also occur in:
■ Oncogenes	■ Cell death genes
■ Tumor suppressor genes	■ Cell signaling genes
■ DNA repair genes	■ Cell cycle checkpoint genes
	■ Cellular senescence genes
	■ Cellular differentiation genes
	■ Metastasis/invasion genes
	■ Carcinogen –activating genes –deactivating genes

Adapted by Jeanne Kelly, © 2004.

Καρκινογένεση = Πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία



Molecular Basis of Cancer

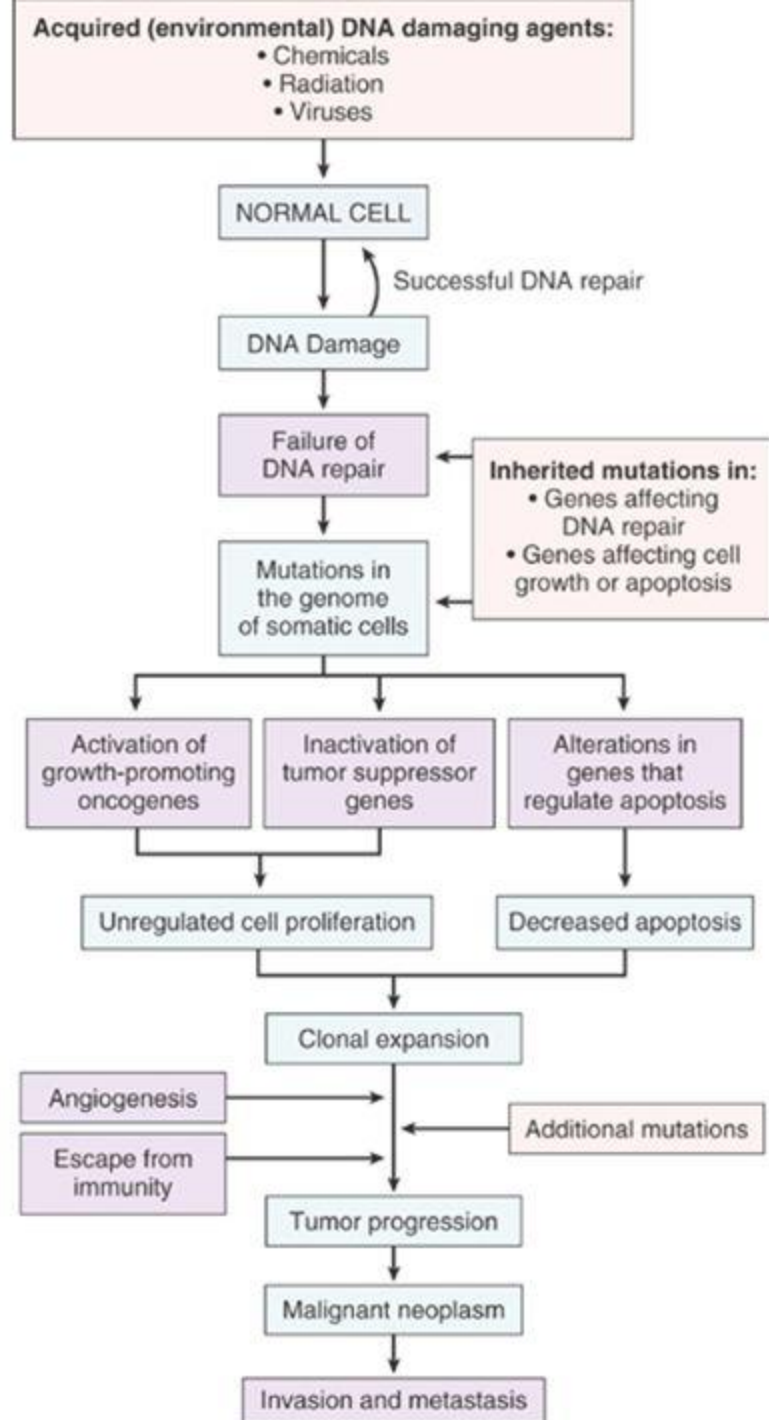
Non lethal genetic damage

Clonal expansion of genetically damaged cells

Involved genes

- **Proto-oncogenes,**
- **Tumor suppressor genes,**
- **Genes regulating apoptosis,**
- **DNA repair genes**

Carcinogenesis is a multi-step process



ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ίικά και κυτταρικά ογκογονίδια

- 1911 Peyton Rous / src RSV pp60
- **V-onc** viral
- **C-onc** cellular και
- **Proto-onc**

1976 Varmus & Bishop
Rous sarcoma virus



Ύπαρξη μεταλλαγμένου
γονιδίου που μετατρέπει
το φυσιολογικό κύτταρο σε
νεοπλασματικό

Viral oncogene v-onc

Γονίδιο που
προϋπάρχει στο
φυσιολογικό DNA :
πρωτο-ογκογονίδιο
Αν μετάλλαξη →
ογκογονίδιο c-onc

Src , βραβείο Nobel
1989

Ρυθμιστικά Γονίδια Κυτταρικού Κύκλου

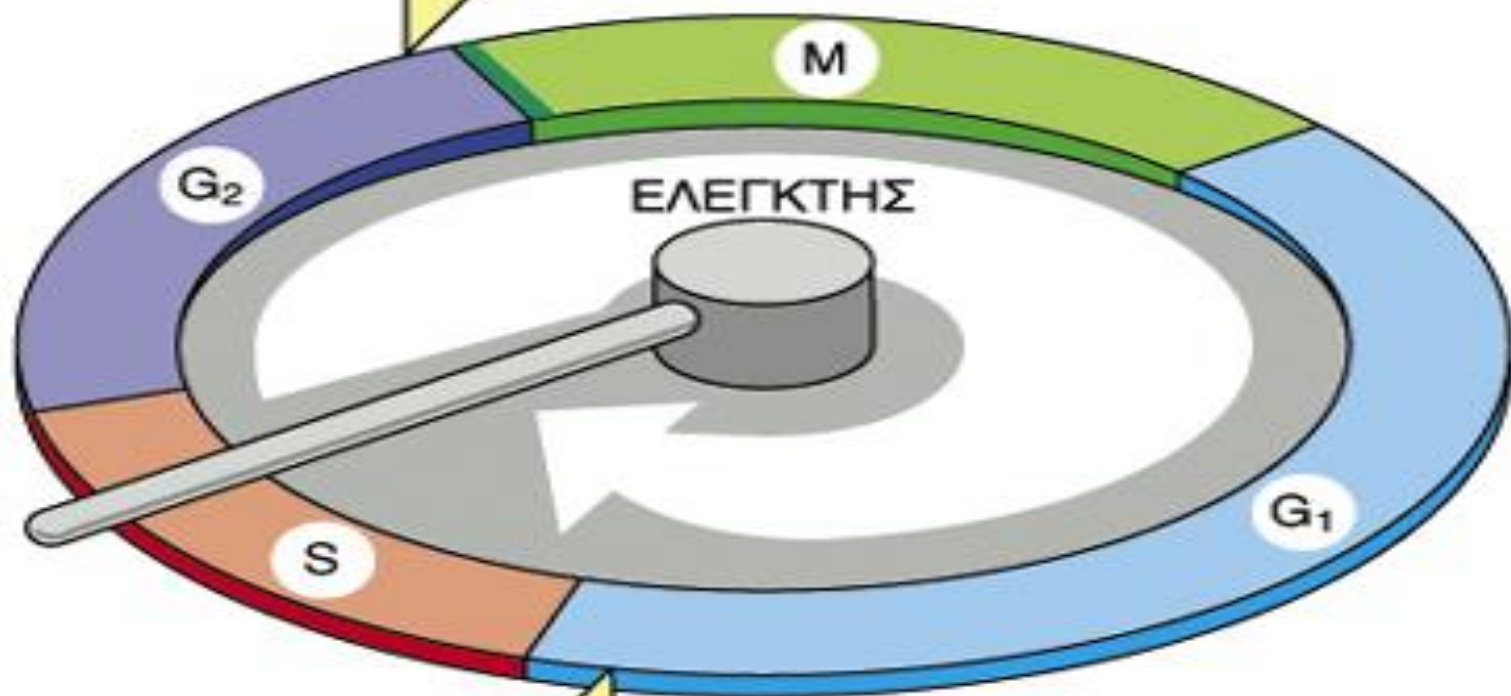
- Πρωτο-ογκογονίδια
- Αντι-ογκογονίδια
(Ογκοκατασταλτικά)

Έχει αντιγραφεί όλο το DNA;

Έχει βλάβες το DNA;

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ G_2

ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΗ ΦΑΣΗ M

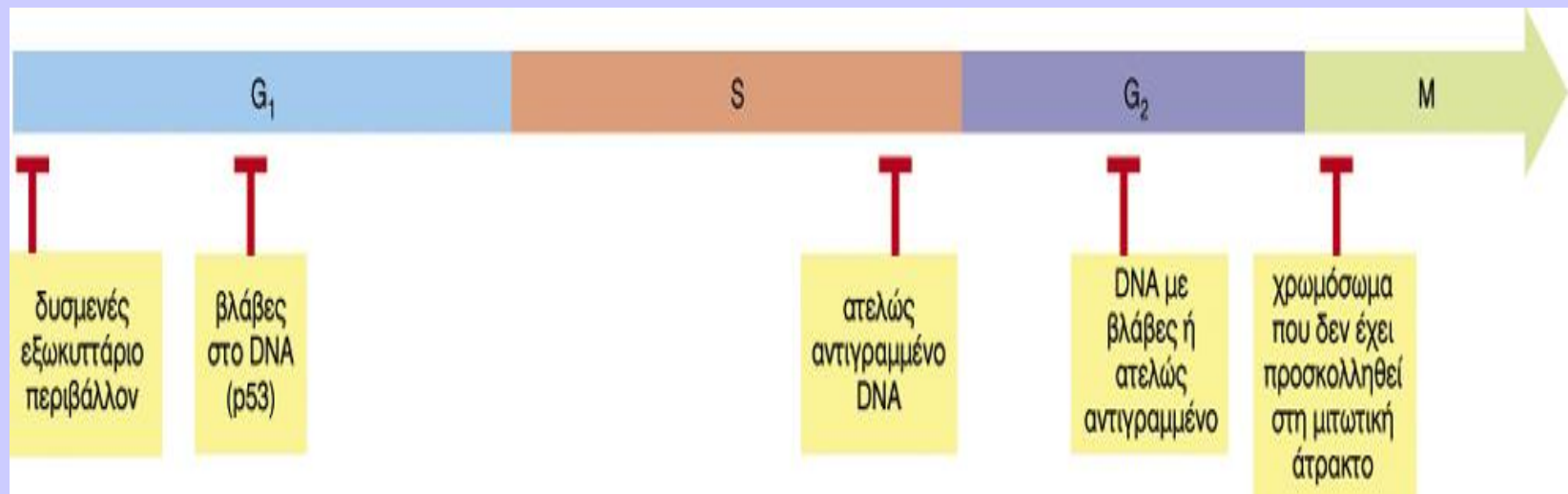


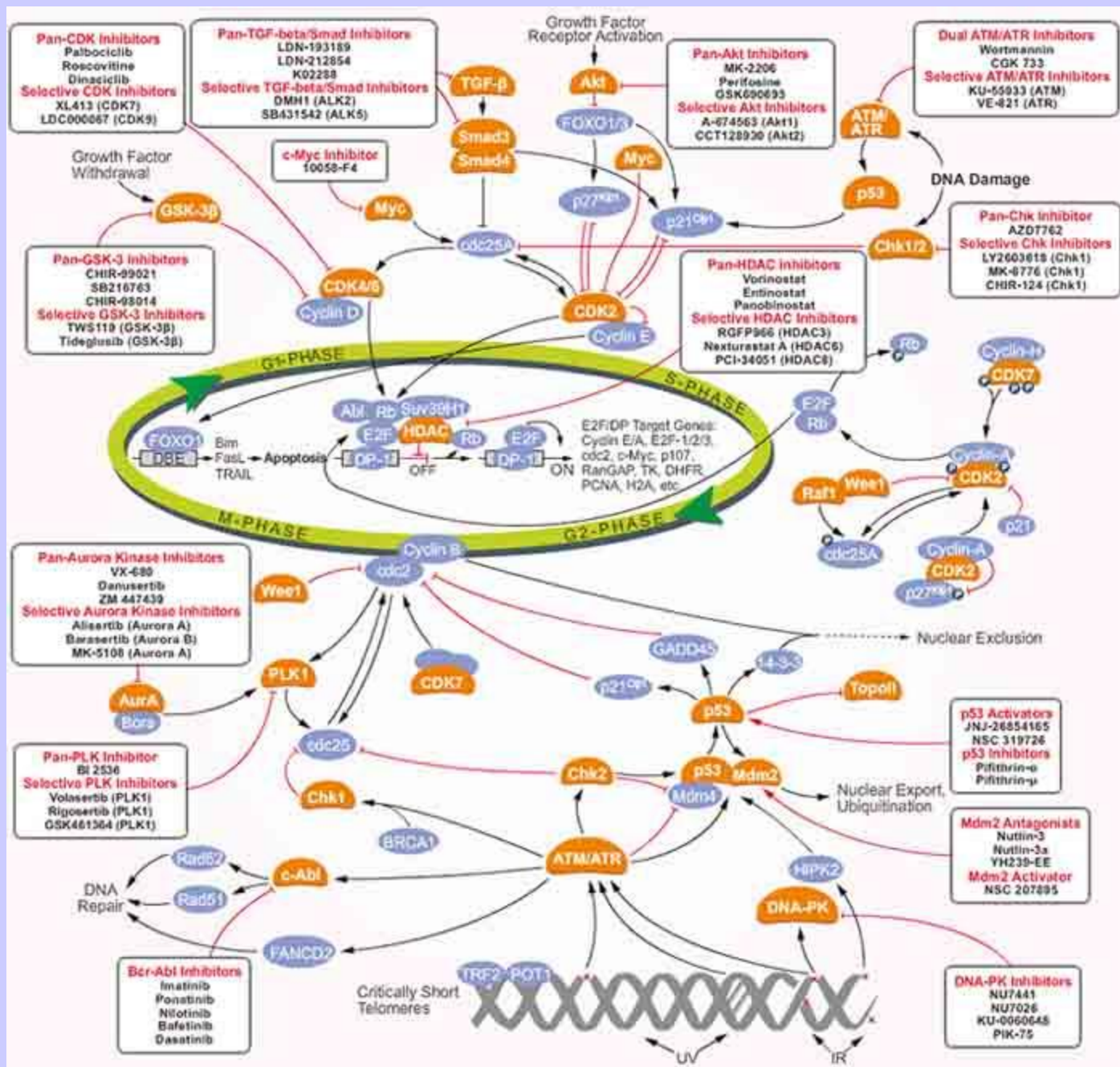
ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΗ ΦΑΣΗ S

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ G_1

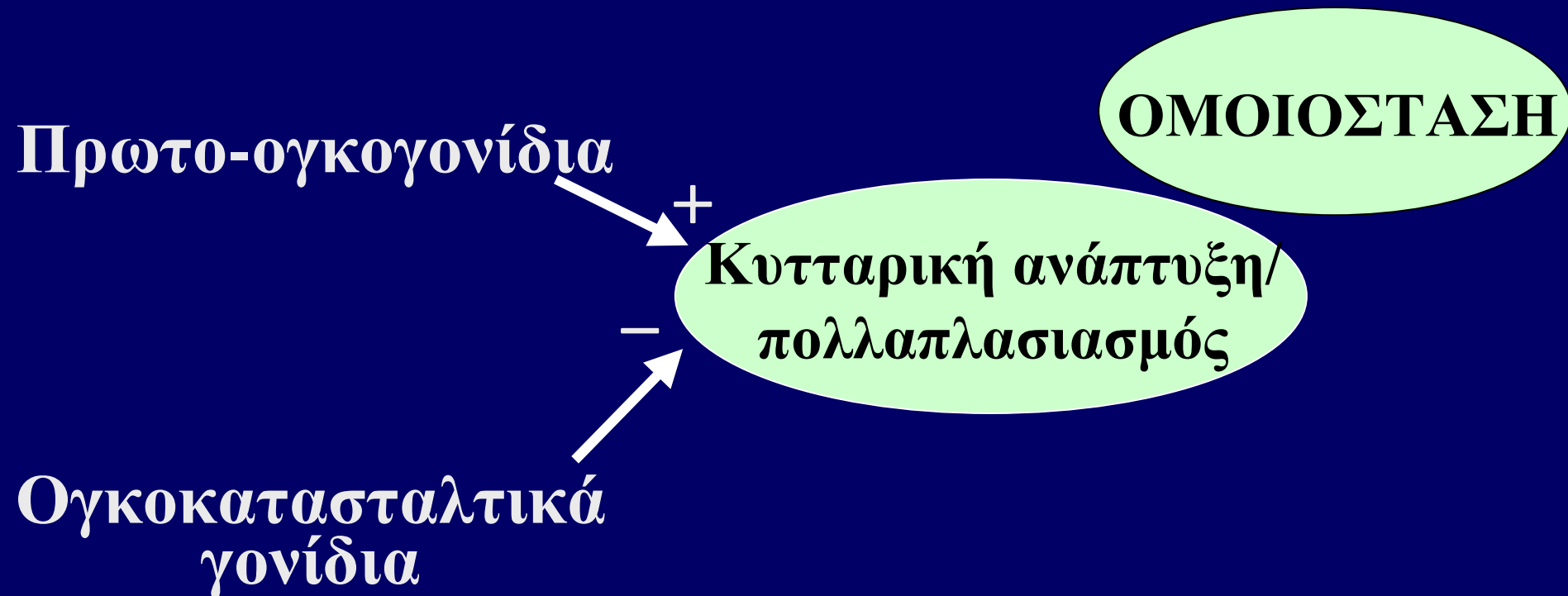
Είναι ευνοϊκό το περιβάλλον;

Έχει βλάβες το DNA;





Ογκογονίδια και Ογκοκατασταλτικά : στη μοριακή βάση του καρκίνου



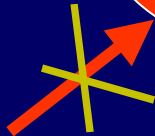
**Απορυθμισμένα
πρωτο-ογκογονίδια**

+++

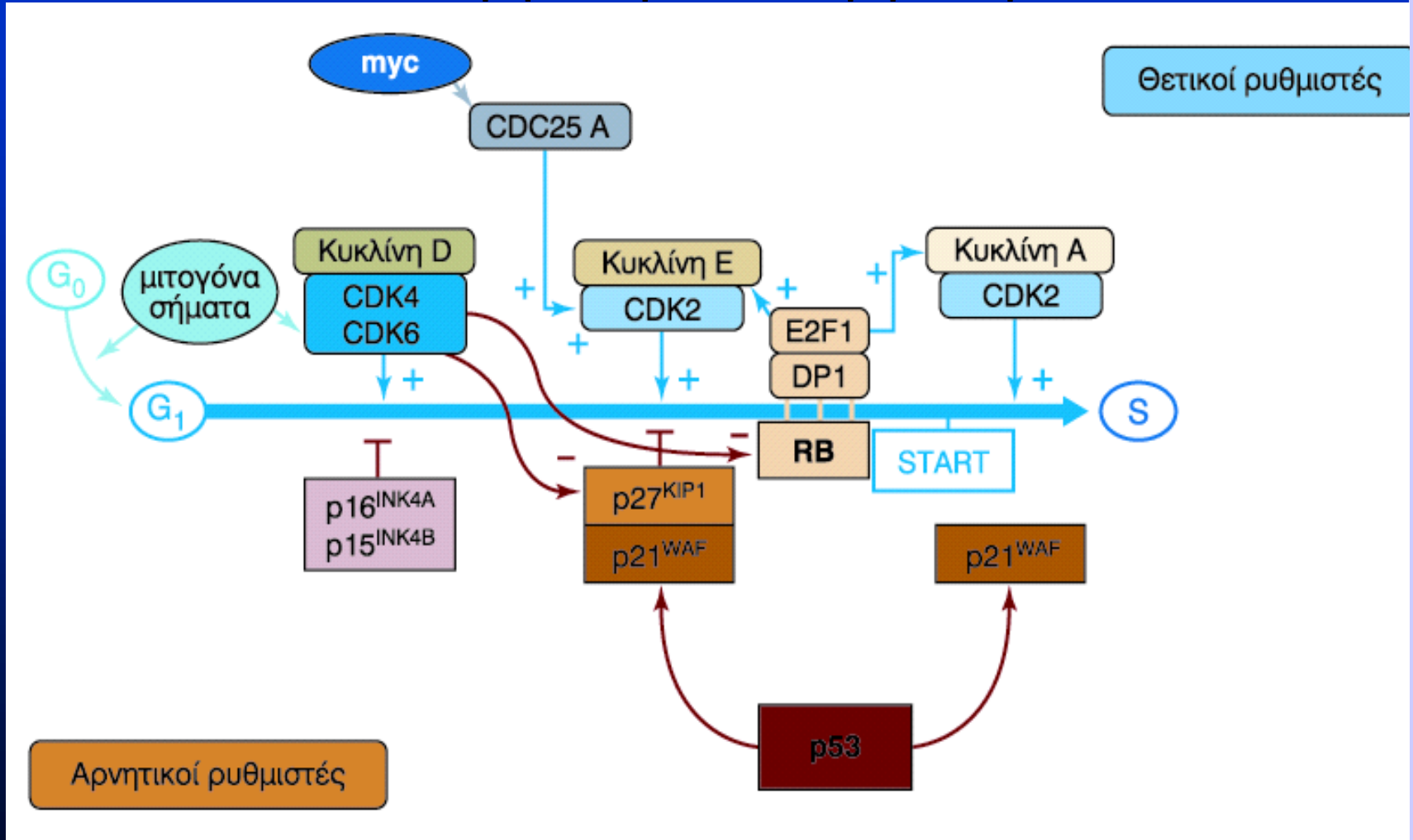
**Κυτταρική ανάπτυξη/
πολλαπλασιασμός**

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

**Αδρανοποιημένα
ογκοκατασταλτικά
γονίδια**



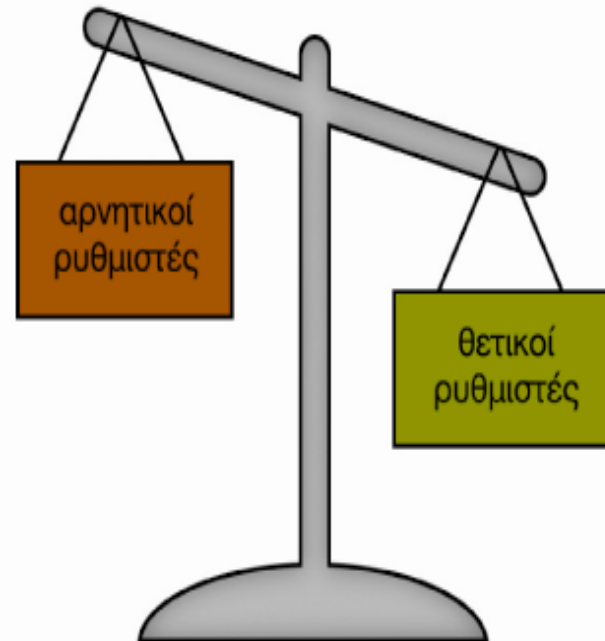
Σημαντικότεροι θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές του ΚΚ από τη φάση G₁ στη φάση S



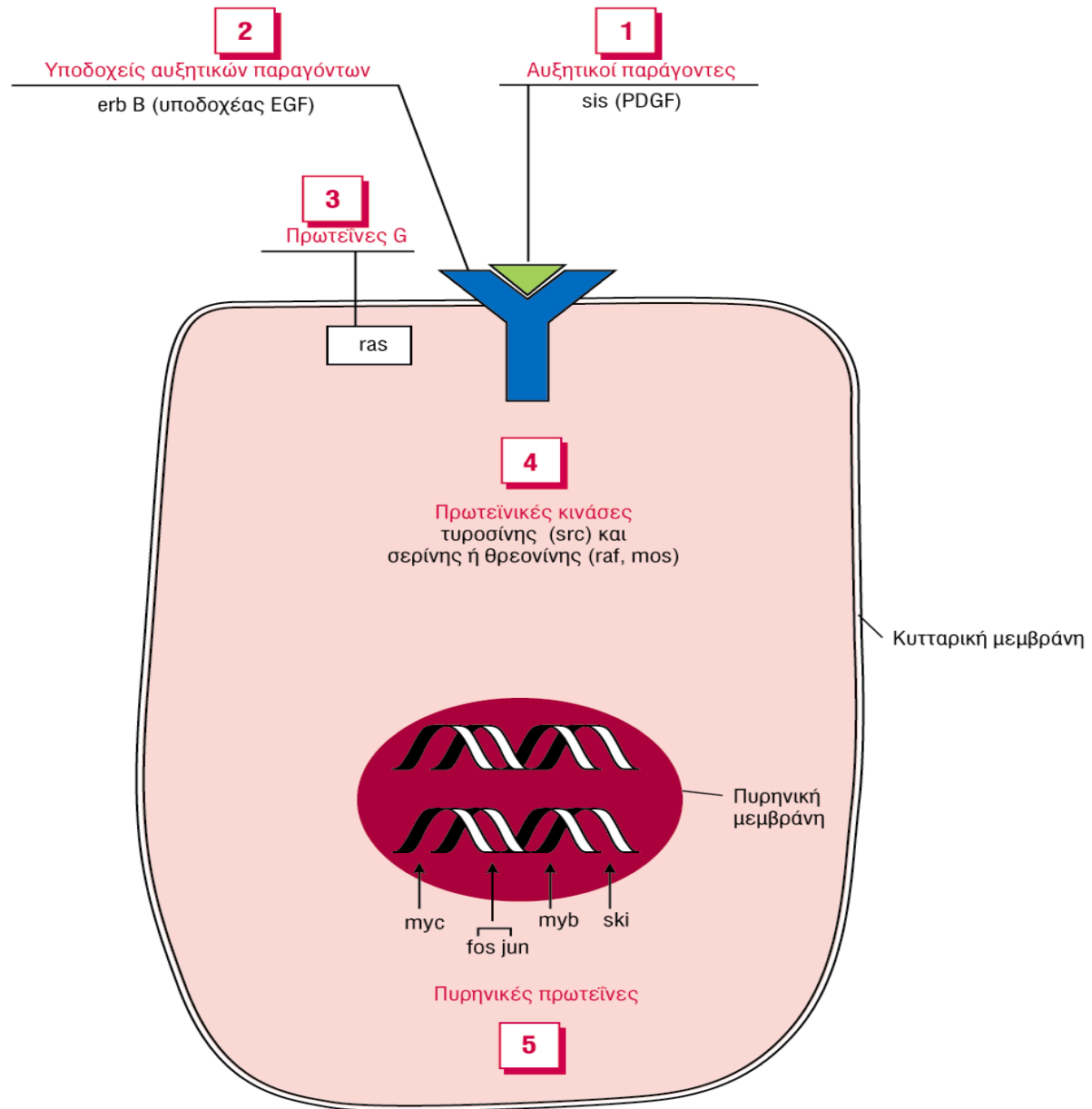
Σήματα από το
μικροπεριβάλλον του όγκου.
Αλλοίωση κρίσιμων γονιδίων



Ισορροπία θετικών
και αρνητικών ρυθμιστών
Μικρός όγκος "εν υπνώσει".

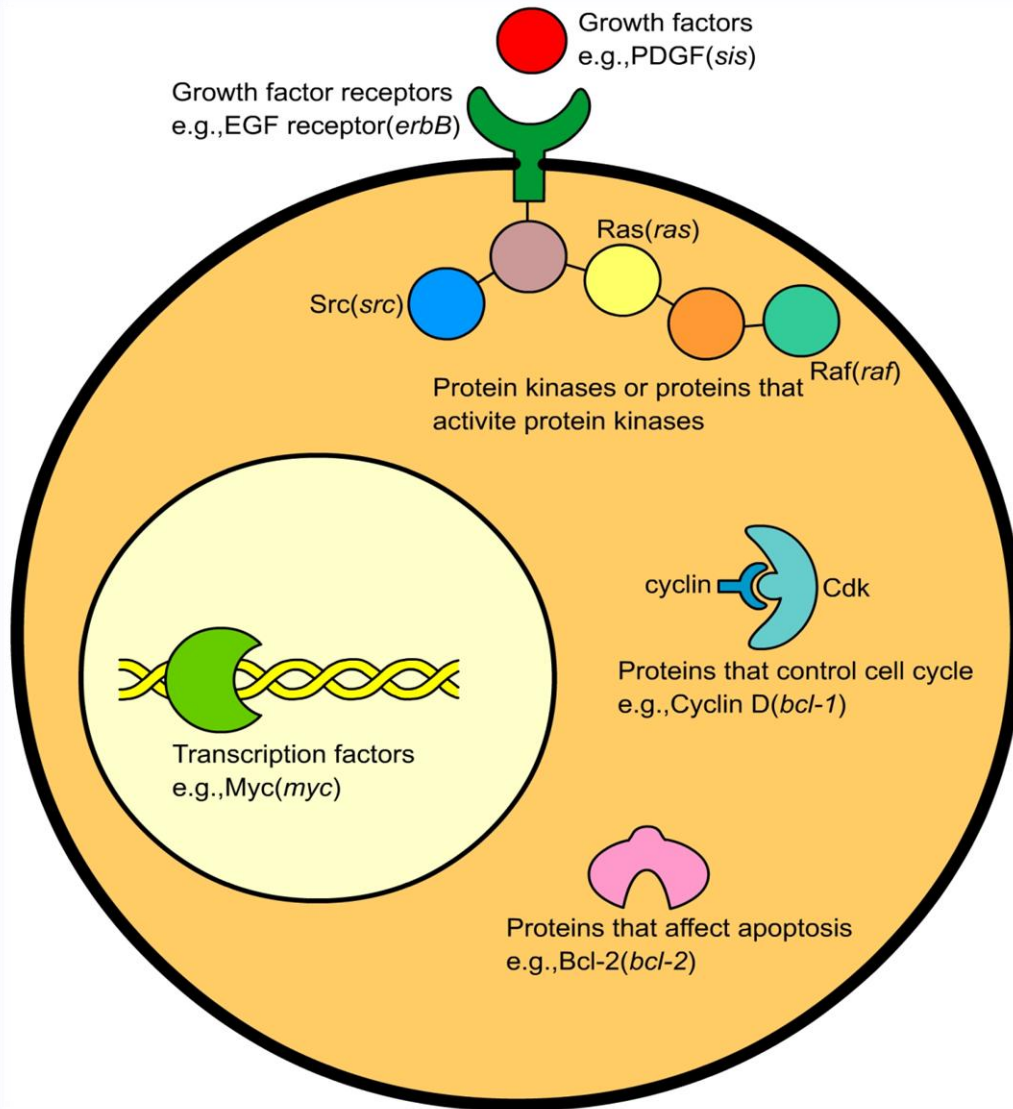


Στροφή στη νεο-αγγειογένεση
angiogenic switch.
Αύξηση του όγκου



Κατηγορίες προϊόντων ογκογονιδίων.

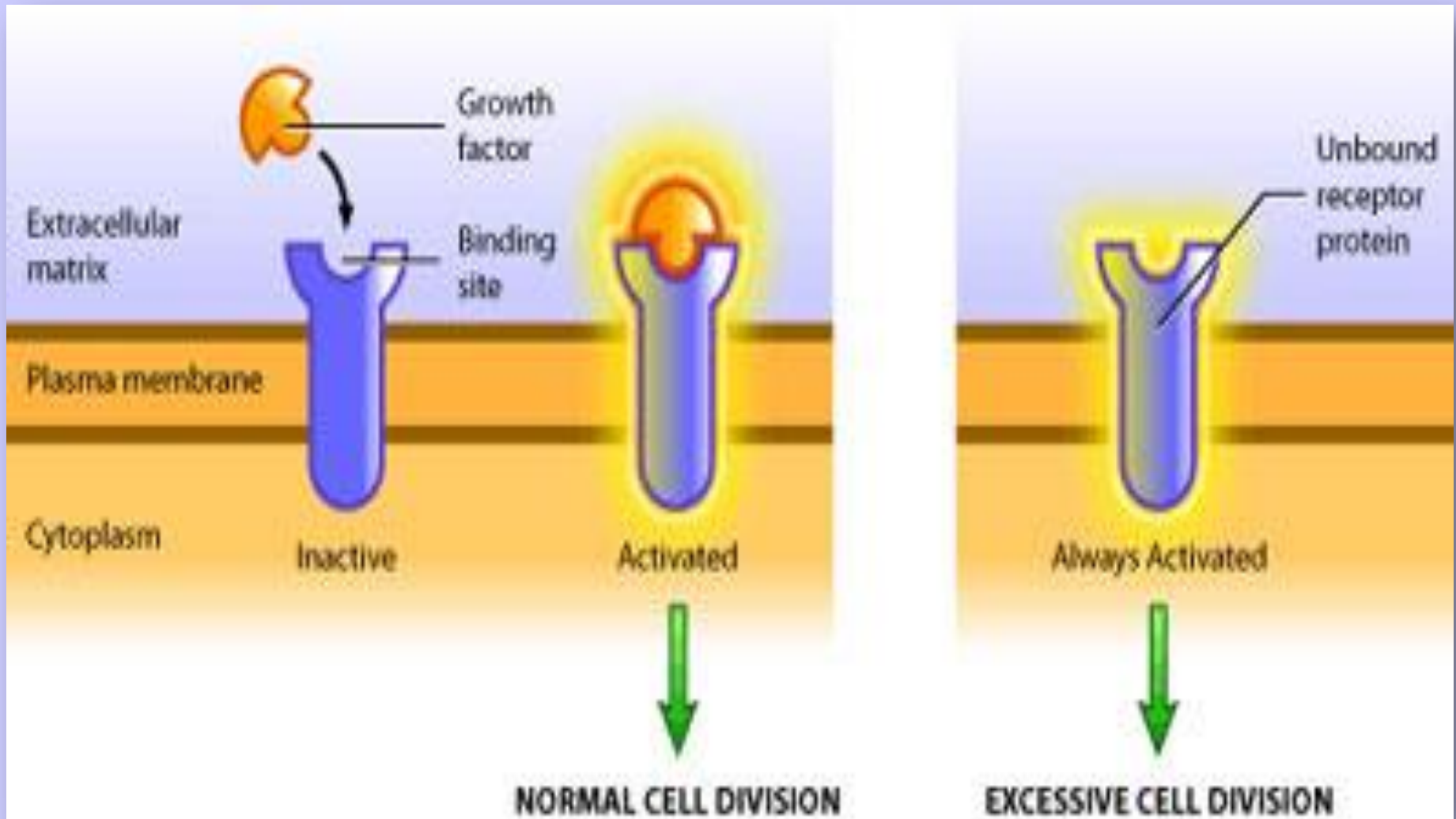
Σχηματική παράσταση των πέντε κατηγοριών όπου ανήκουν τα προϊόντα των ογκογονιδίων καθώς και η εντόπισή τους.

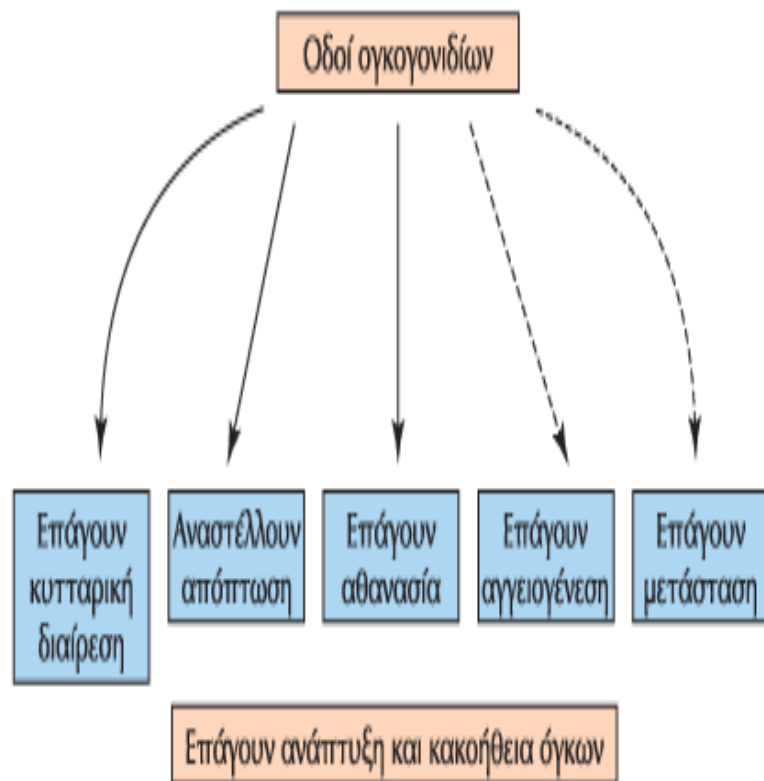


ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ

1. Ογκογονίδια που κωδικοποιούν για αυξητικούς παράγοντες ή μιτογόνα (*c-sis*)
2. Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (EGFR, PDGFR, VEGFR, HER2/*neu*)
3. Κυτταροπλασματικές κινάσες
 - A. τυροσίνης (*Src*, *Abl-CML*, Philadelphia chromosome)
 - B. σερίνης/θρεονίνης και οι ρυθμιστικές υπομονάδες τους (CDKs)
4. Ρυθμιστικές GTPάσες (*ras*)
5. Μεταγραφικοί παράγοντες (*c-myc*)

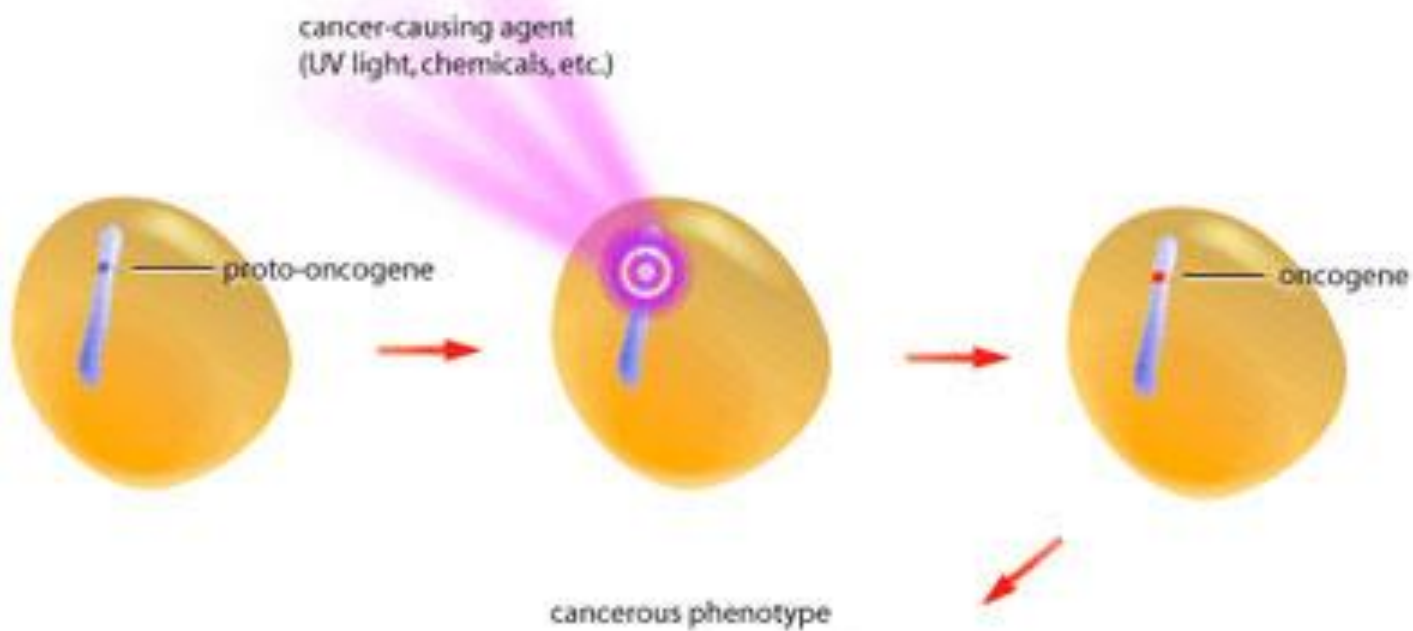
Παράδειγμα τροποποιημένου υποδοχέα





ΕΙΚΟΝΑ 25.16

Οδοί ογκογονιδίων. Οι οδοί ογκογονιδίων προάγουν την κυτταρική διαίρεση, αναστέλλουν την απόπτωση, επάγουν κυτταρική αθανασία, προάγουν τη μετάσταση κυττάρων όγκου, και προάγουν την αγγειογένεση στον όγκο. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν την εμπλοκή κυττάρων εκτός των κυττάρων του όγκου.



ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ

- διπλή φύση

Φυσιολογική μορφή : πρωτο-ογκογονίδιο

Μέσω ενεργοποίησης: ογκογονίδιο

- Κληρονόμηση μέσω επικρατούς τύπου

Μηχανισμοί ενεργοποίησης ογκογονιδίων

πρωτο-ογκογονίδιο \longrightarrow ογκογονίδιο

αλλαγές με αντίκτυπο στο πρωτεϊνικό προϊόν ή στην έκφραση του γονιδίου

1. Σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή των πρωτο-ογκογονιδίων
2. Χρωμοσωμική μετάθεση/μετατόπιση
3. Αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης

genetic predisposition
carcinogens
irradiation
mutagens
viruses

↓
damaging

normal

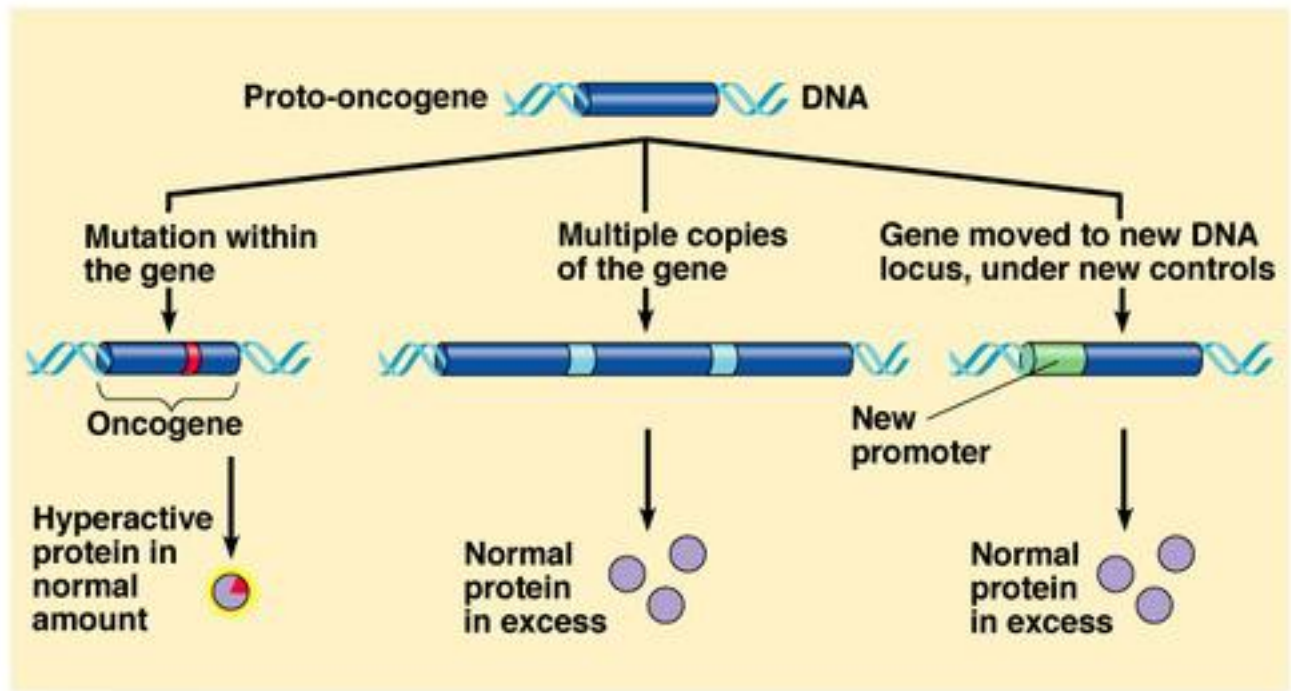
↓
proto-oncogene

↓
normal
cellular
function

→ cellular oncogene

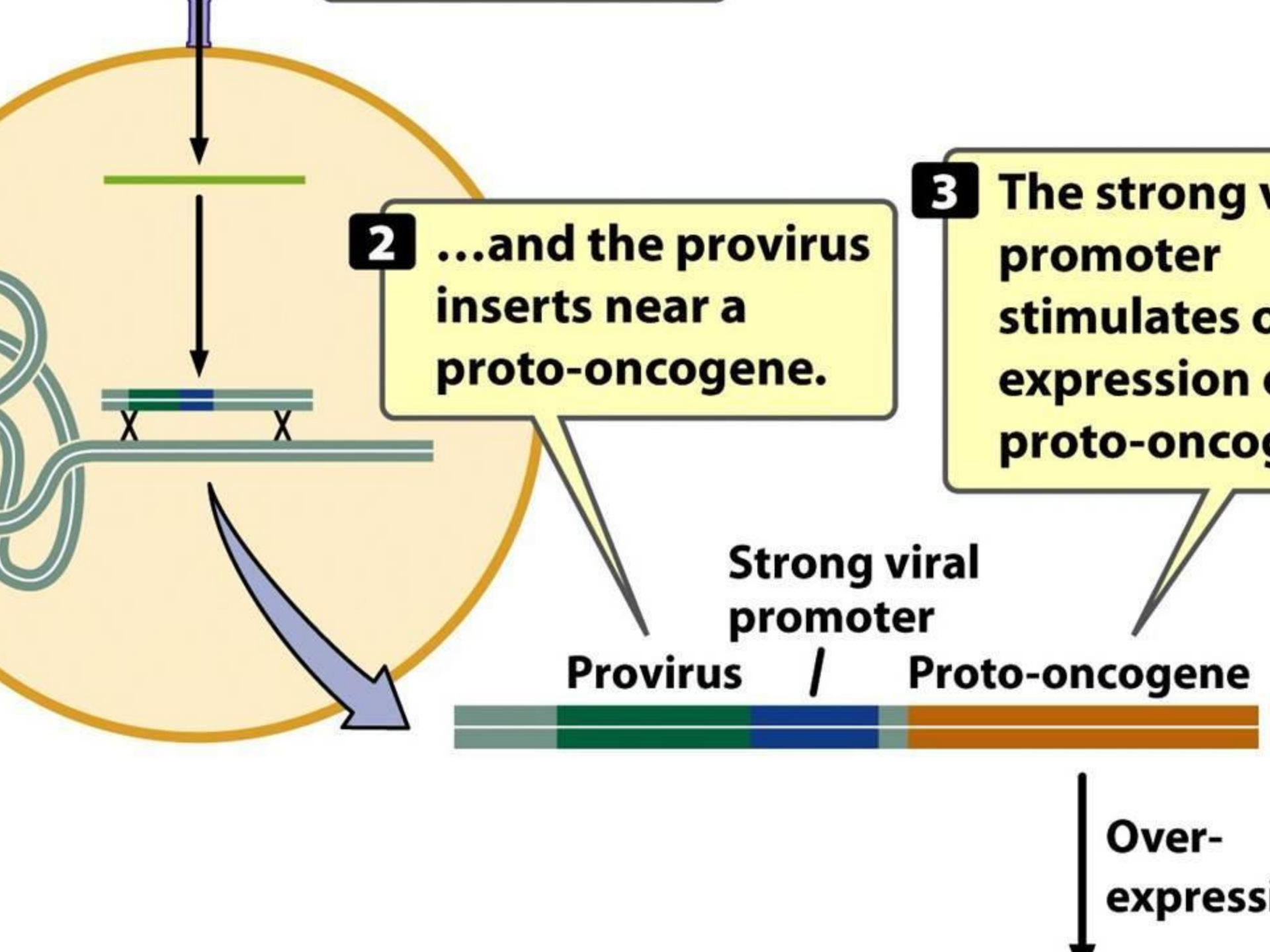
↓
altered cellular function

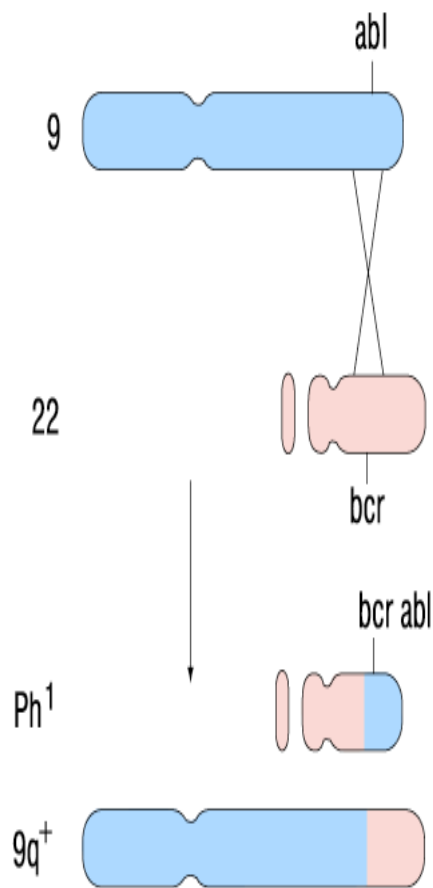
↓
neoplasia



Μηχανισμοί ενεργοποίησης ογκογονιδίων

- **Αλλαγές στη δομή** πχ σημειακές μεταλλάξεις, μετατοπίσεις (Ras, Χρ.Ph 9,22)
- **Αλλαγή στην έκφραση** πχ Λέμφωμα Burkitt όπου υπάρχει ανταλλαγή τμημάτων ανάμεσα σε Χρ. 8 (c-myc) και Χρ. 2,14 ή 22 (όπου βρίσκονται τα γονίδια παραγωγής ανοσοσφαιρινών)

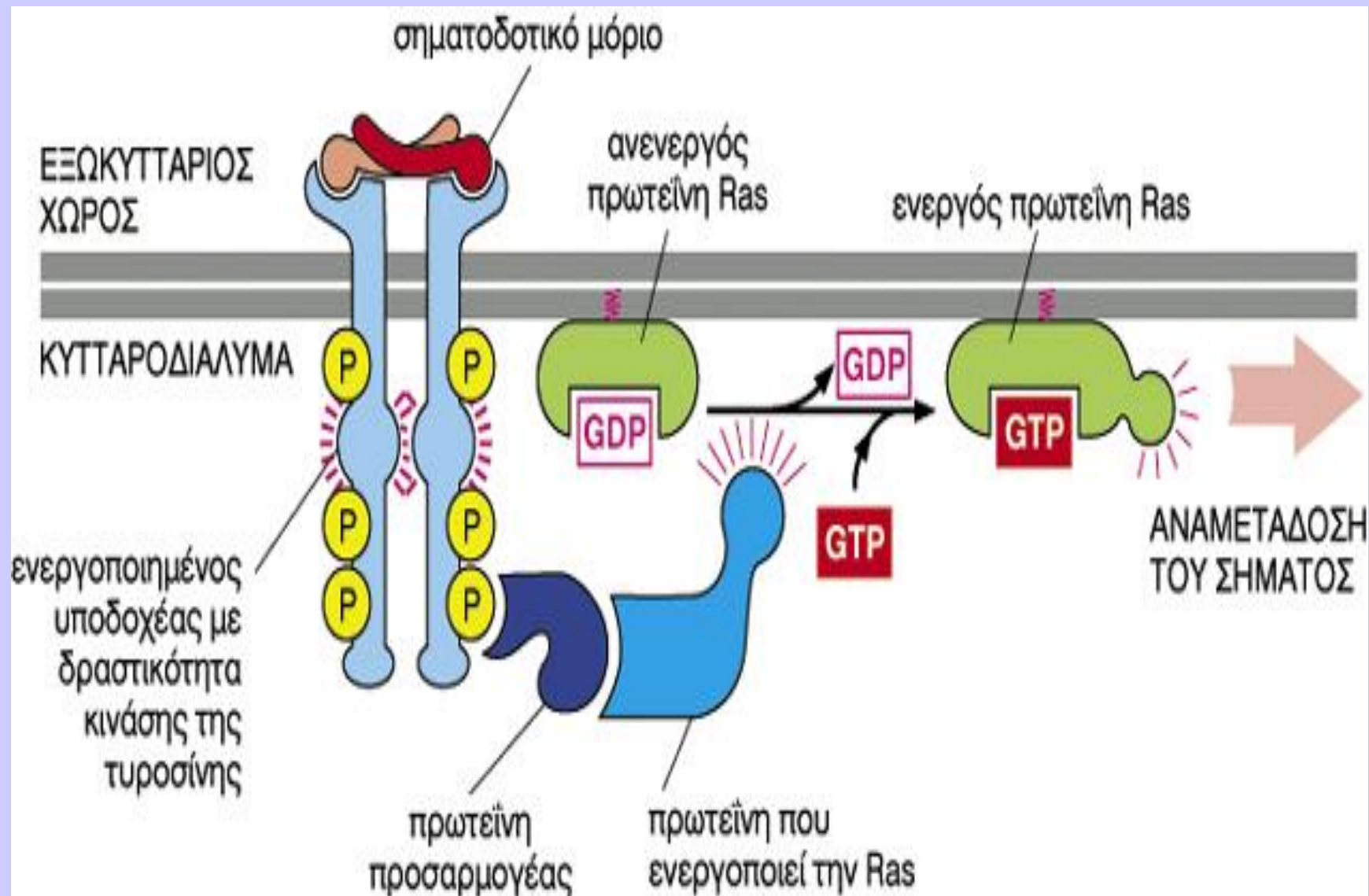




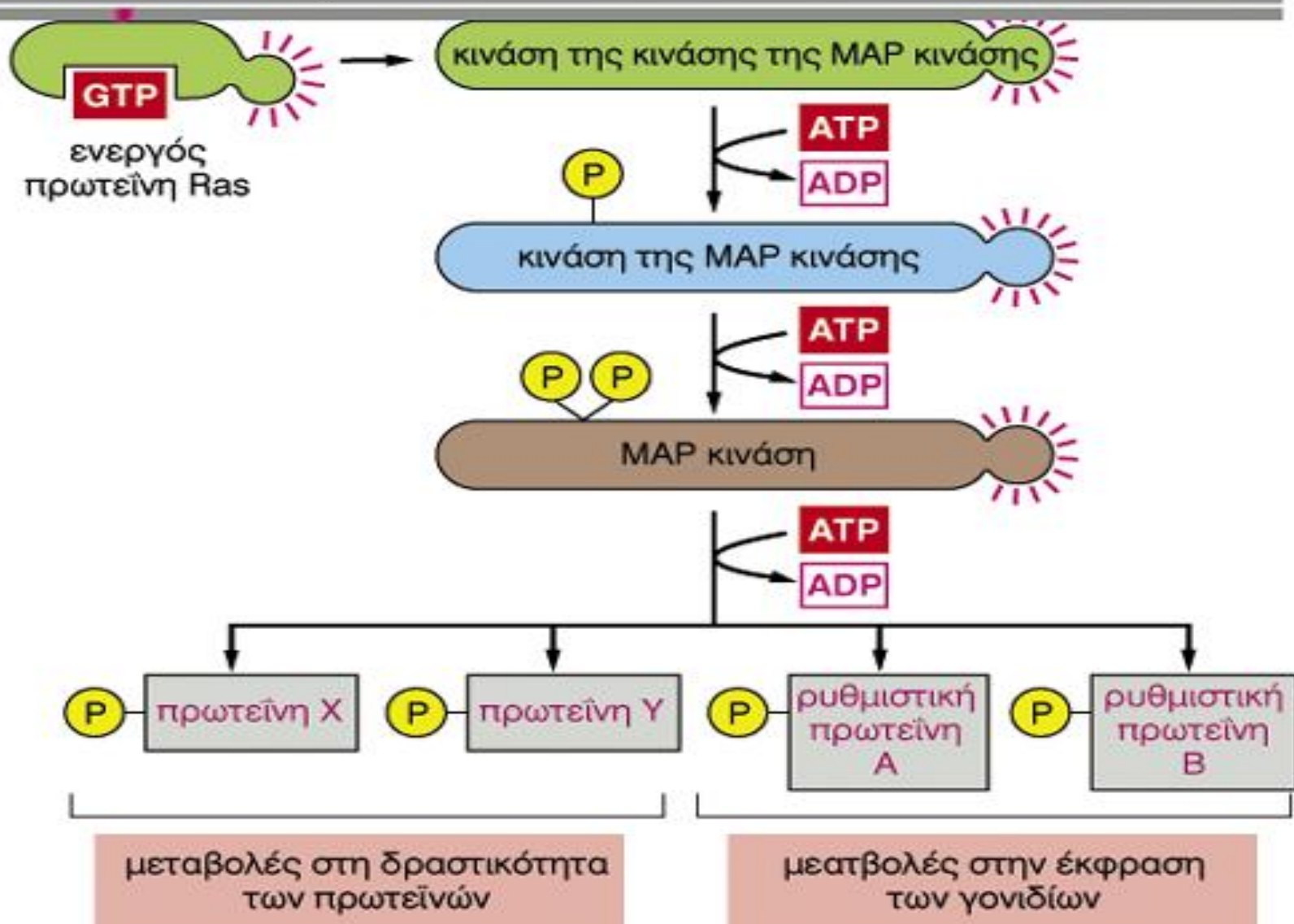
Το χρωμόσωμα της Φιλαδελφείας (Ph¹) προκύπτει από αμοιβαία μετάθεση ανάμεσα στα χρωμοσώματα 9 και 22 που φέρουν αντίστοιχα τα πρωτο-ογκογονίδια *c-abl* και *c-bcr*. Το χρωμόσωμα 22 μετά τη μετατόπιση κωδικοποιεί για μία χιμαιρική πρωτεΐνη *bcr-abl* (περιέχει την αμινοτελική περιοχή του γονιδίου *bcr* ενωμένη με το τμήμα της ενεργού πρωτεϊνικής κινάσης του γονιδίου *abl*) και αποτελεί το χρωμόσωμα της Φιλαδελφείας Ph¹.

Ενεργοποίηση γονιδίου Ras

- Πρωτεΐνη Ras = μονομερής G
- Λειτουργεί ως Μοριακός Διακόπτης δηλ ενεργός / ανενεργός λόγω δραστικότητας GTPάσης
- Απώλεια δραστικότητας οδηγεί σε συνεχή ενεργή μορφή, συνεχή σήματα για αύξηση και καρκινικό μετασχηματισμό.

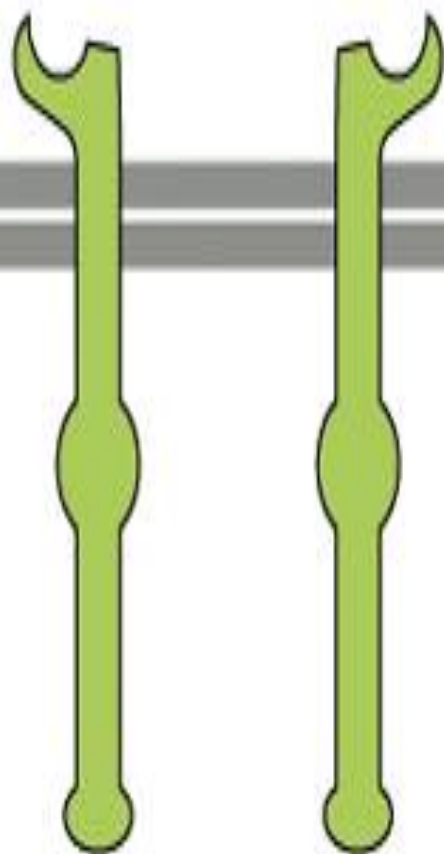


κυτταρική μεμβράνη

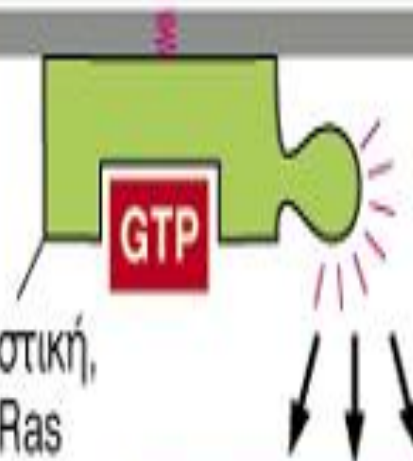


ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ
ΧΩΡΟΣ

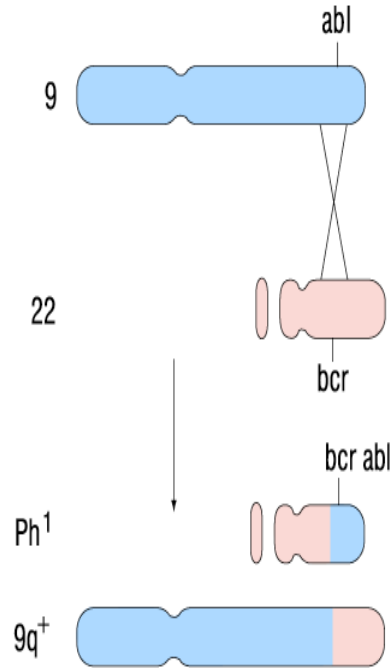
ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΛΥΜΑ



ιδιοσύστατα δραστική,
μεταλλαγμένη Ras
(δεν υδρολύει το GTP)



ΣΥΝΕΧΗΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗ
ΣΗΜΑΤΟΣ ΣΕ ΠΟΛΕΣ
ΟΔΟΥΣ ΑΠΟΥΣΙΑ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ
ΜΟΡΙΟΥ



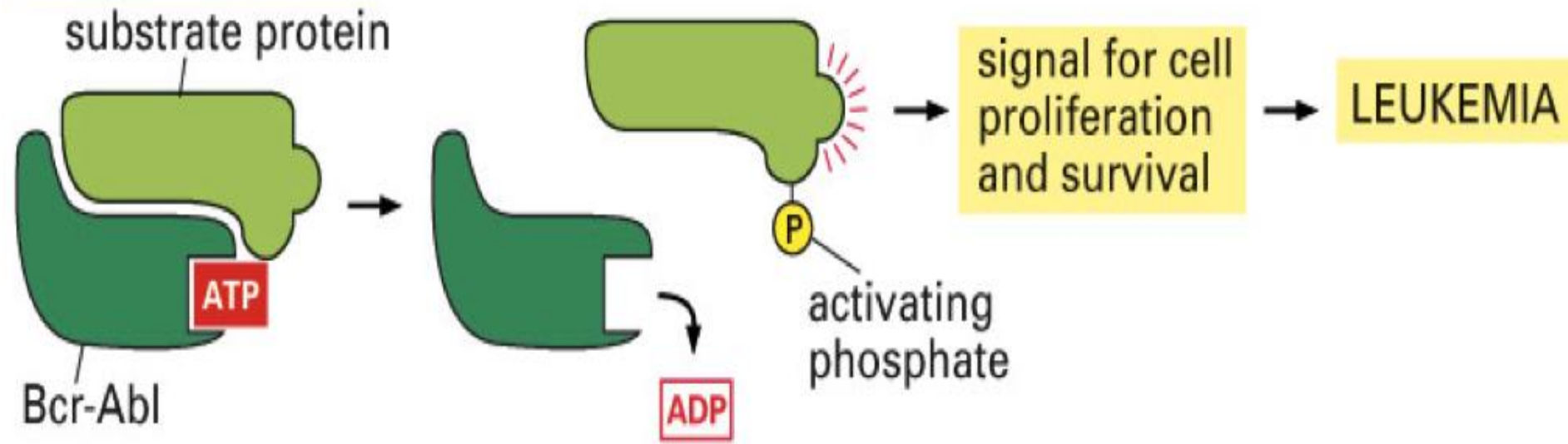
Το χρωμόσωμα της Φιλαδελφείας (Ph¹) προκύπτει από αμοιβαία μετάθεση ανάμεσα στα χρωμοσώματα 9 και 22 που φέρουν αντίστοιχα τα πρωτο-ογκογονίδια *c-abl* και *c-bcr*. Το χρωμόσωμα 22 μετά τη μετατόπιση κωδικοποιεί για μία χμαιρική πρωτεΐνη *bcr-abl* (περιέχει την αμινοτελική περιοχή του γονιδίου *bcr* ενωμένη με το τμήμα της ενεργού πρωτεϊνικής κινάσης του γονιδίου *abl*) και αποτελεί το χρωμόσωμα της Φιλαδελφείας Ph¹.

Gleevec (ιματινίβη)

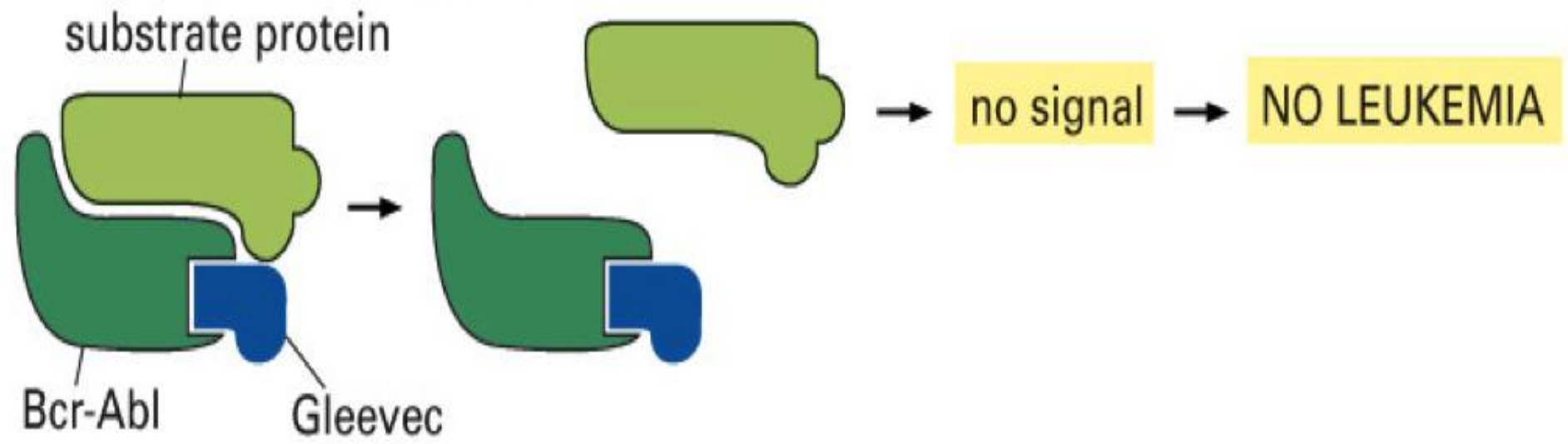
- Φάρμακο στοχεύει προϊόν ογκογονιδίου.
- Αναστέλλει ενεργότητα Τυροσινικής κινάσης της bcr-abl στη CML.
- Δεσμεύεται στη ATP θέση δέσμευσης των κινασών αναστέλλοντας τη φυσιολογική δέσμευση.
- 95% αποτελεσματικότητα στο αρχικό στάδιο της CML.

(C)

BCR-ABL ACTIVE



BCR-ABL BLOCKED WITH GLEEVEC



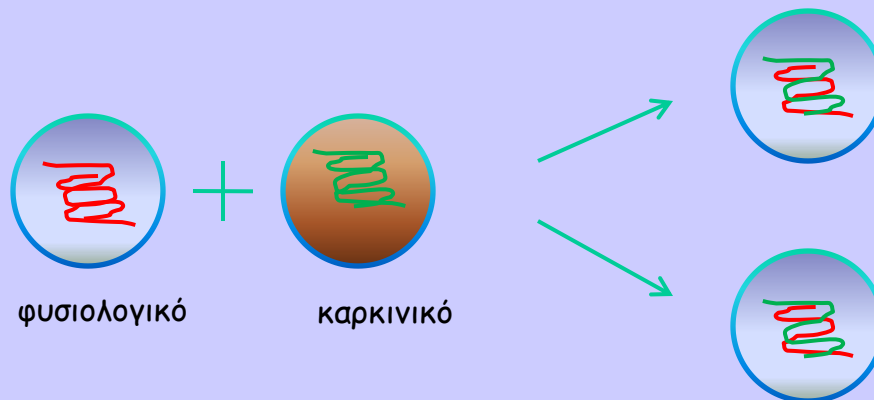
Ογκογονίδια σε ανθρώπινους όγκους

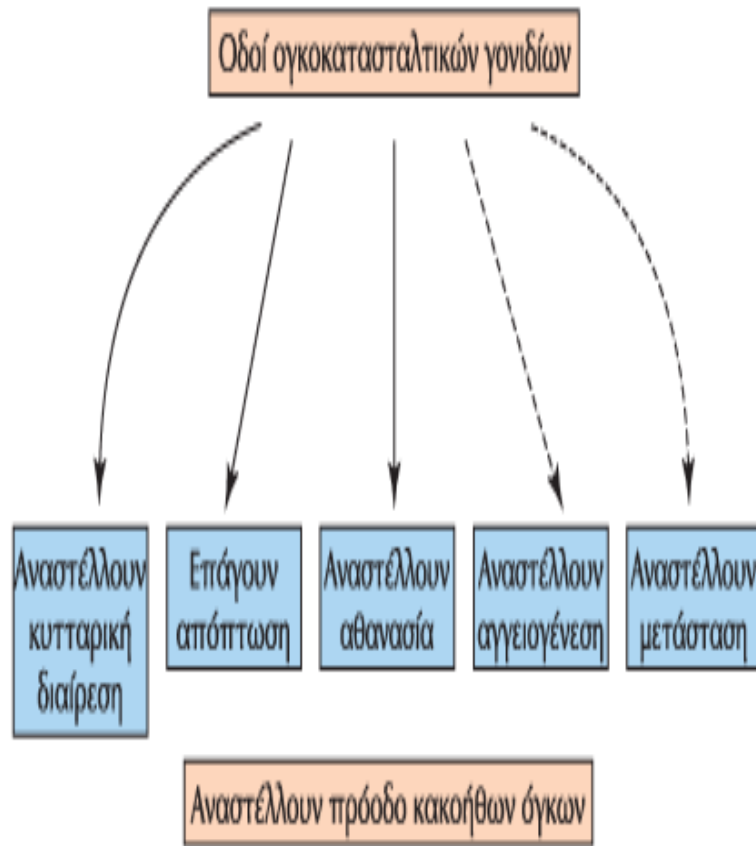
Ογκογονίδιο	Όγκος	Μηχανισμός ενεργοποίησης	Ρόλος
RAF	καρκίνος στομάχου	αναδιάταξη	κυτταροπλασματική κίνηση σερίνης/θρεονίνης
MYC	λεμφώματα, καρκινώματα	ενίσχυση, χρωμοσωμική διαμετάθεση	πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας
NMYC	νευροβλάστωμα	ενίσχυση	πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας
LMYC	μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα	ενίσχυση	πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας
BCL2	θυλακοειδή και αδιαφοροποίητα λεμφώματα	χρωμοσωμική διαμετάθεση	αντι-αποπτωτικός παράγοντας
H-RAS1	καρκίνος ουροδόχου κύστης	σημειακή μετάλλαξη	πρόσδεση GDP/GTP
K-RAS2	καρκίνος πνεύμονα και παχέος εντέρου	σημειακή μετάλλαξη	πρόσδεση GDP/GTP
N-RAS	λευχαιμίες	σημειακή μετάλλαξη	πρόσδεση GDP/GTP
HST	καρκίνος στομάχου	αναδιάταξη	αυξητικός παράγοντας
ERBB	καρκίνος μαστού, γλοιοβλάστωμα	ενίσχυση	υποδοχέας αυξητικών παραγόντων
ERBB2	καρκίνος μαστού, ωθηκών και στομάχου	ενίσχυση	υποδοχέας αυξητικών παραγόντων κυτταρικής επιφανείας

ΑΝΤΙ- ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ Η΄ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

- δρουν εμποδίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καταστέλλοντας έτσι την ογκογένεση
- ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση, επιδιορθώνουν βλάβες στο DNA, οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση
- Οι μεταλλάξεις δρουν κατά τον υποτελή τρόπο
"Θεωρία των δύο χτυπημάτων"

Επιβεβαίωση ύπαρξης με πειράματα κυτταρικής σύντηξης



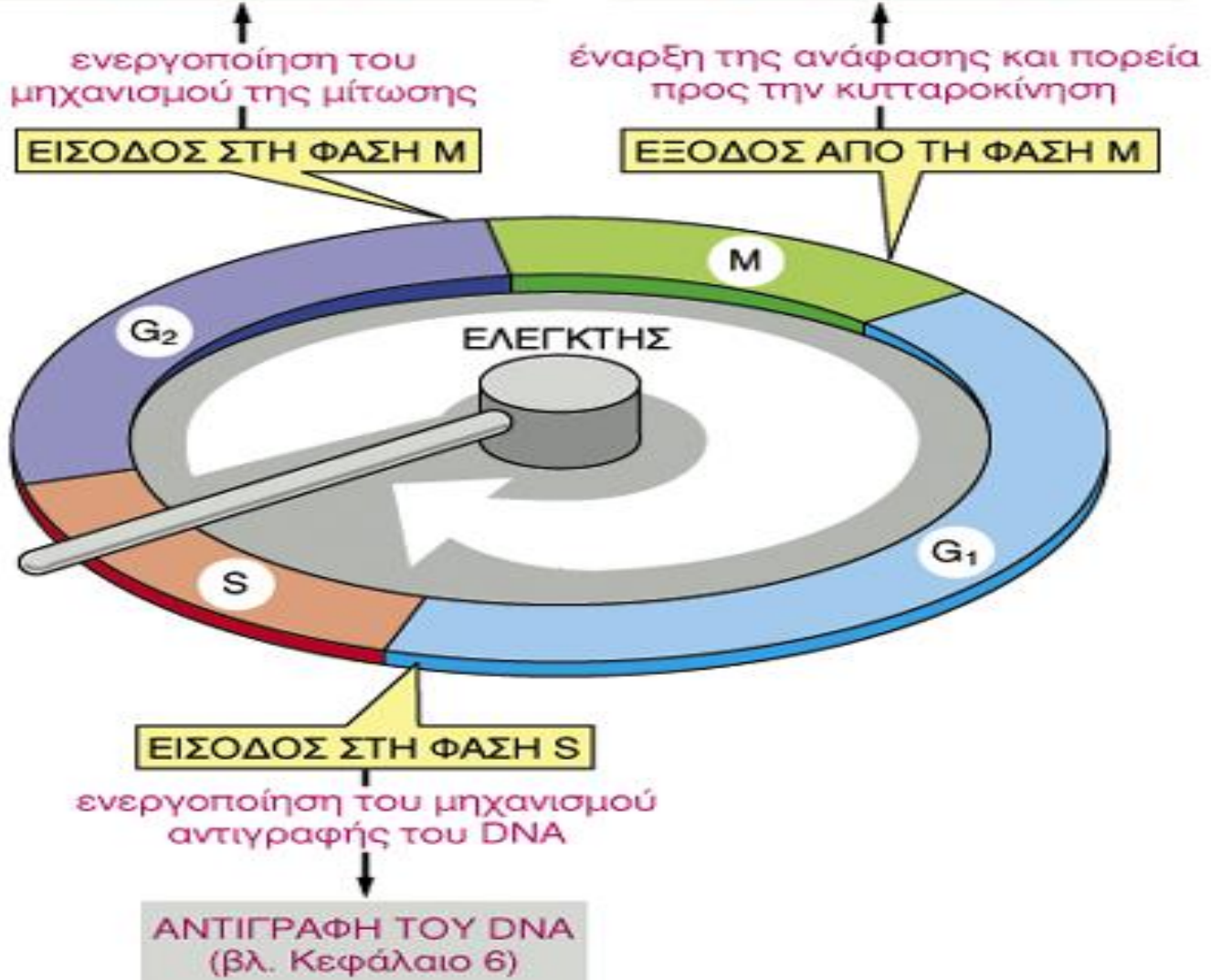


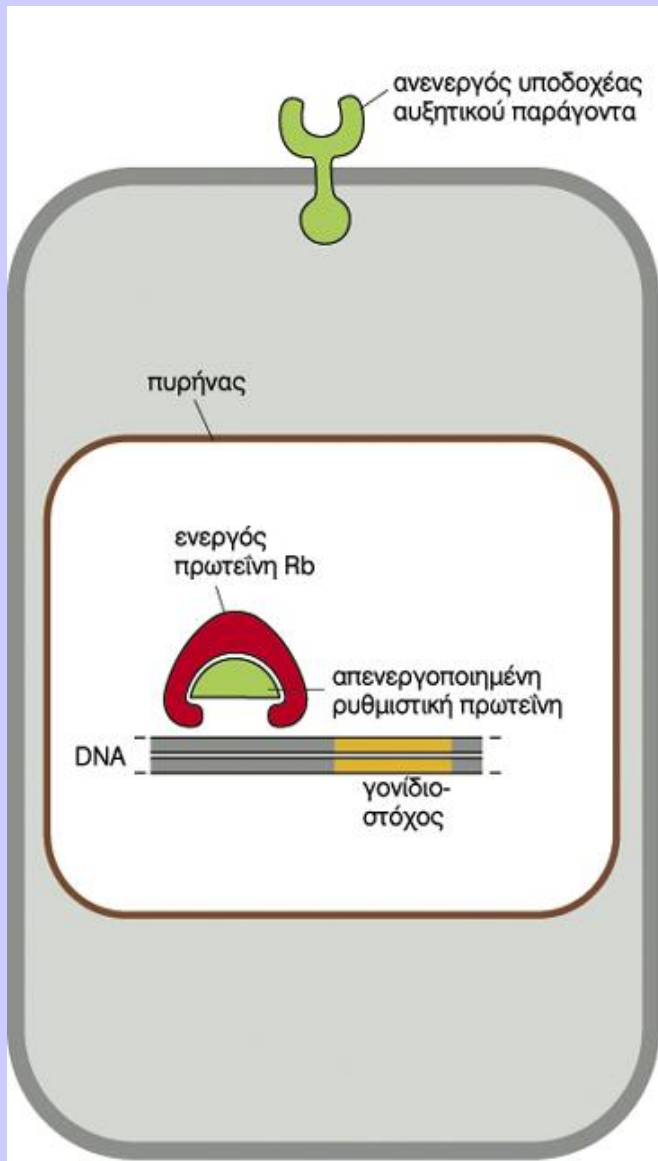
ΕΙΚΟΝΑ 25.17

Οδοί ογκοκαταστολέων. Οι οδοί ογκοκαταστολέων αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, επάγουν την απόπτωση, αναστέλλουν την κυτταρική αθανασία, αναστέλλουν τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων και αναστέλλουν την αγγειογένεση στον όγκο.

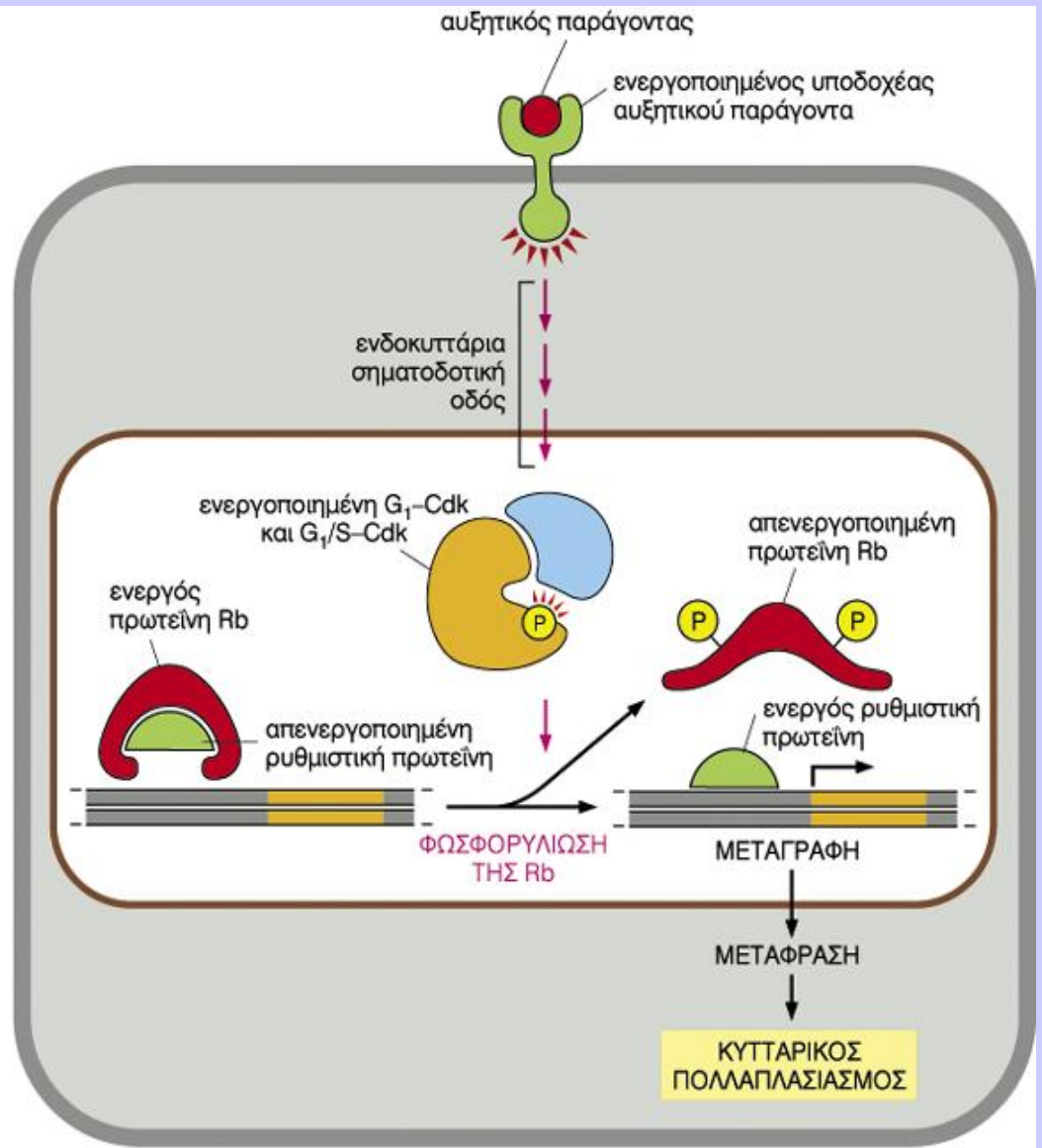
ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ
ΤΗΣ ΜΙΤΩΤΙΚΗΣ ΑΤΡΑΚΤΟΥ
(βλ. Κεφάλαιο 19)

ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ
(βλ. Κεφάλαιο 19)



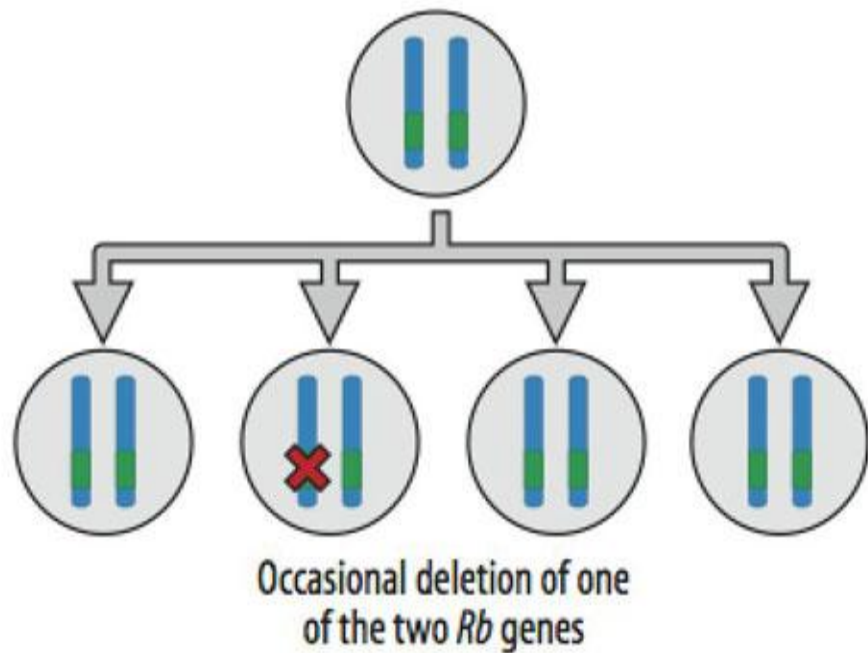


(A) ΚΥΤΤΑΡΟ ΣΕ ΗΡΕΜΙΑ



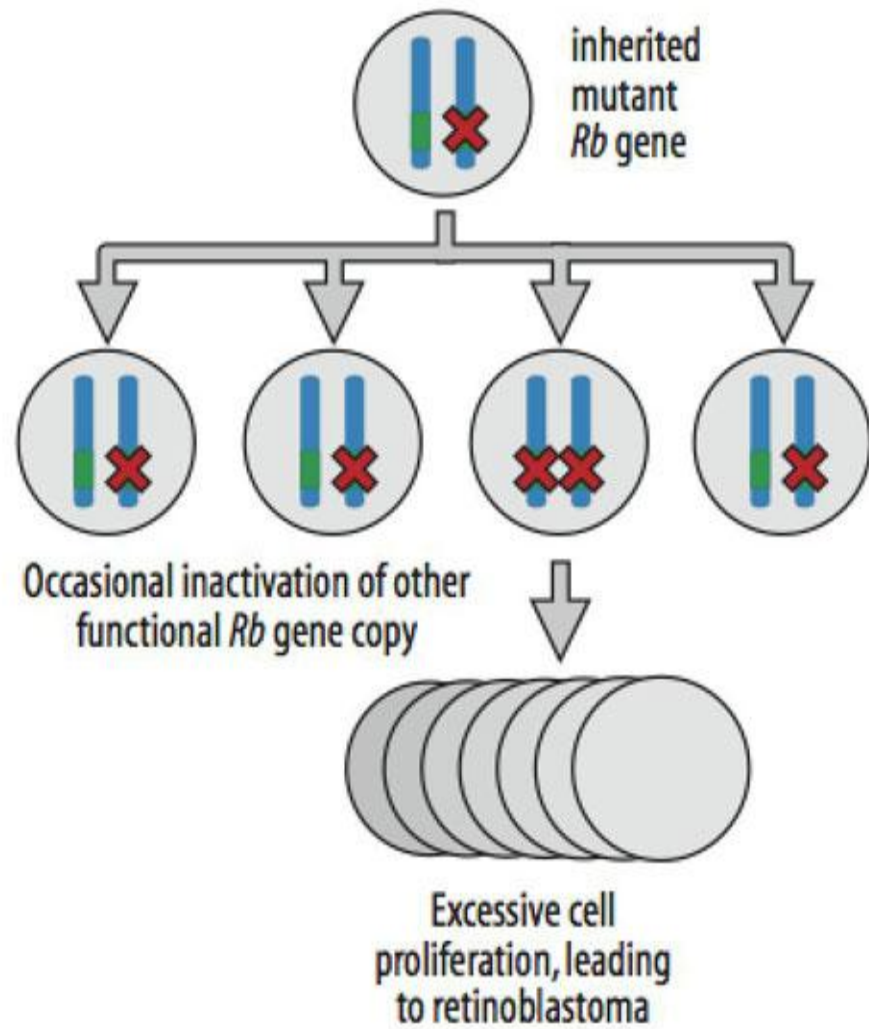
(B) ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΖΟΜΕΝΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Normal individual



No tumor formation

Hereditary retinoblastoma



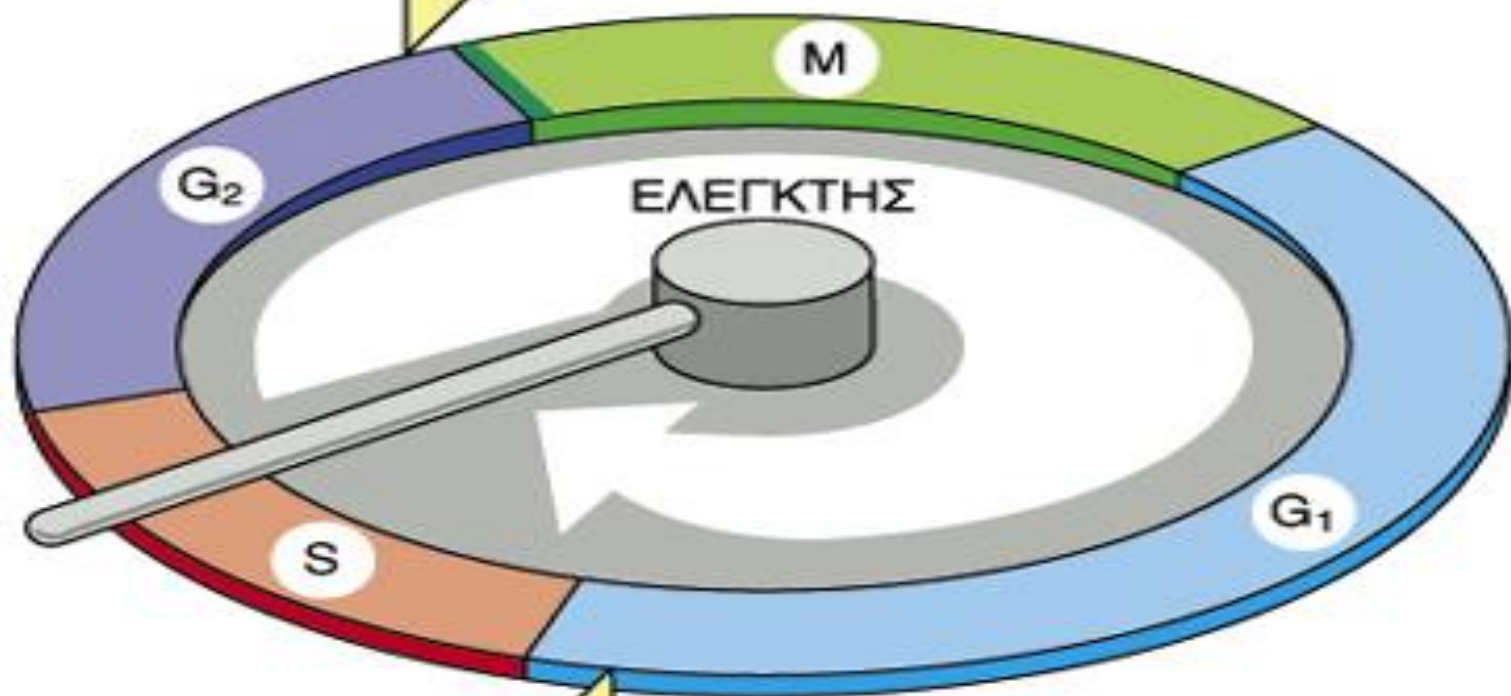
Tumor formation

Έχει αντιγραφεί όλο το DNA;

Έχει βλάβες το DNA;

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ G_2

ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΗ ΦΑΣΗ M



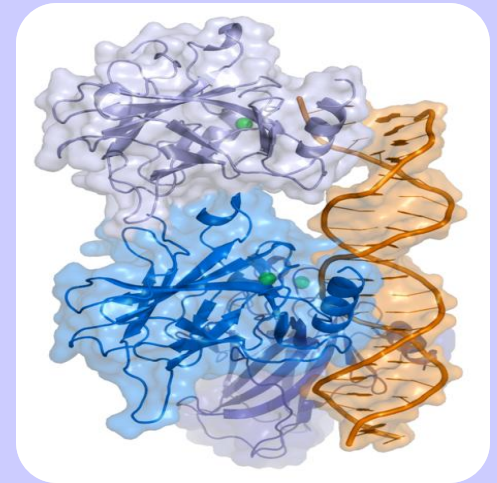
ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΗ ΦΑΣΗ S

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ G_1

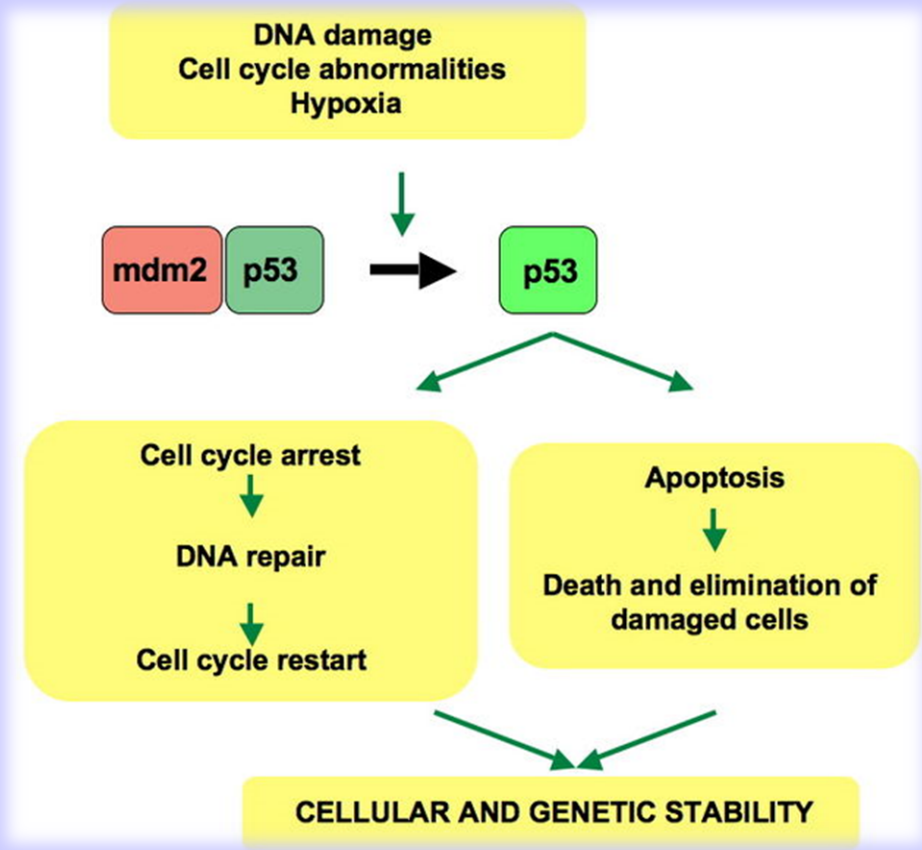
Είναι ευνοϊκό το περιβάλλον;

Έχει βλάβες το DNA;

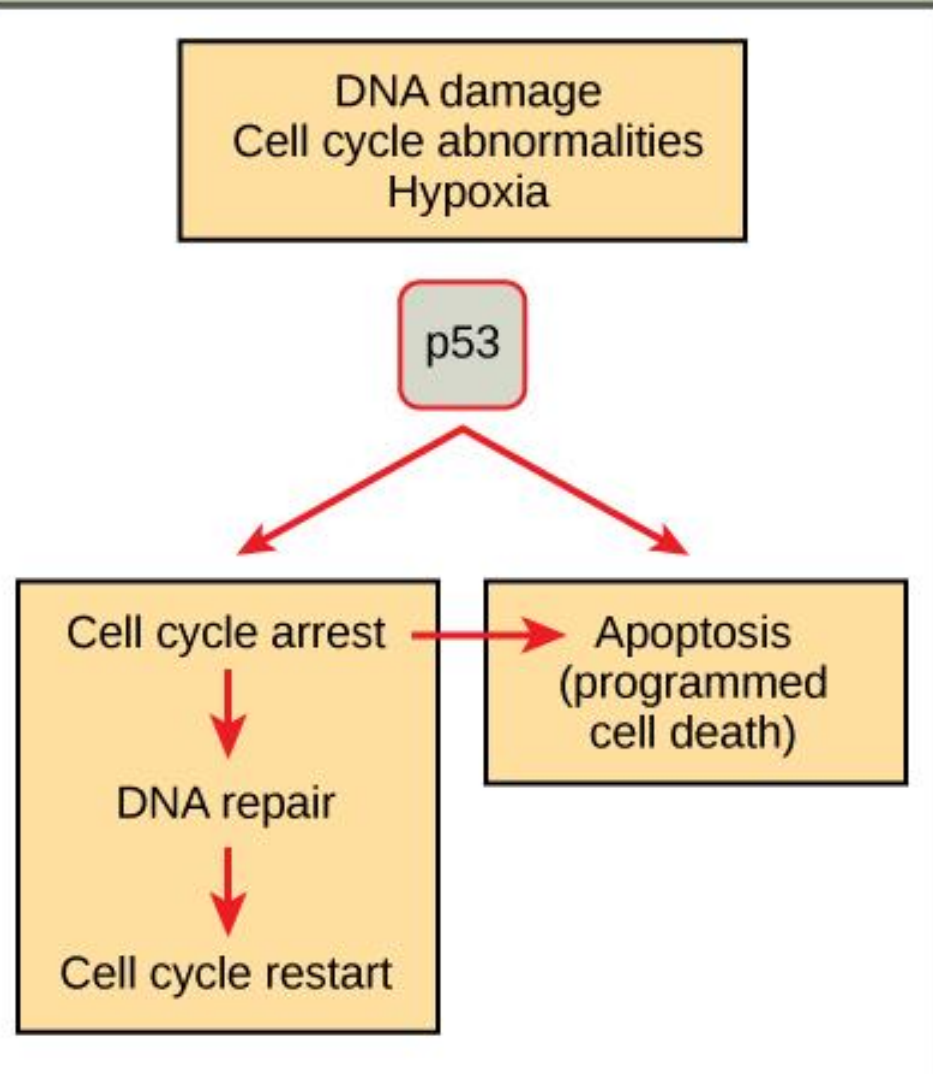
p53 “ο φρουρός του γονιδιώματος”



p53 3-D structure

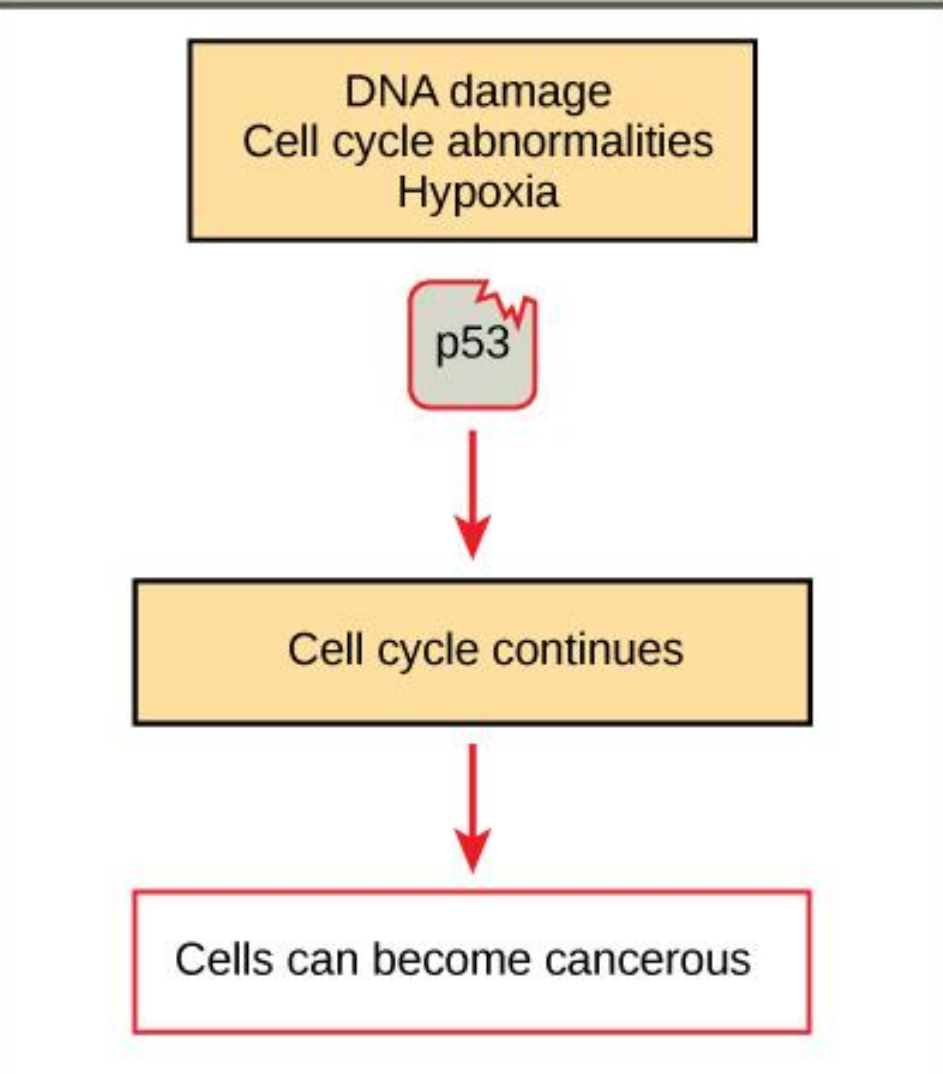


(a) Normal p53



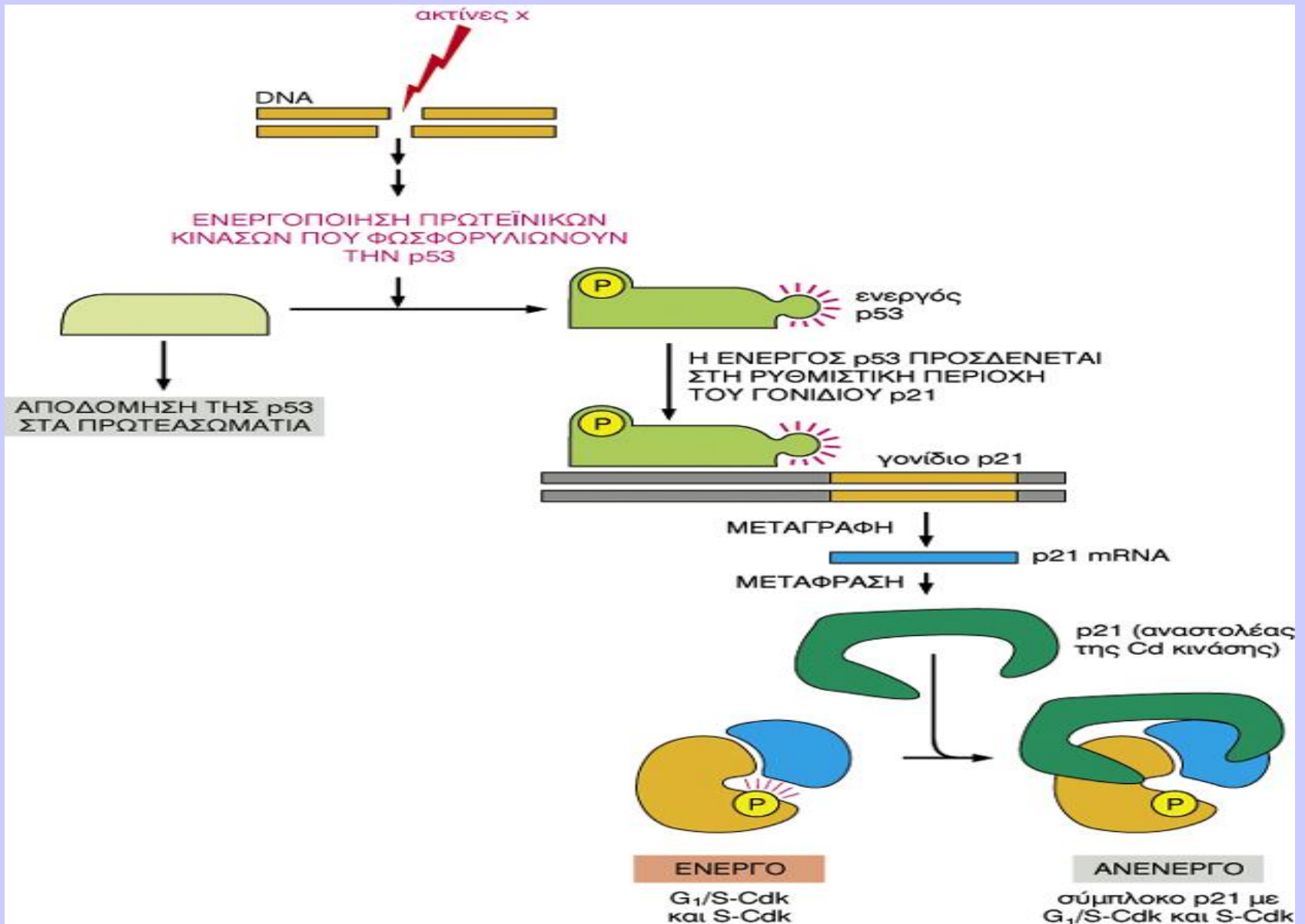
When cellular damage occurs, p53 arrests the cell cycle until the damage is repaired. If damage cannot be repaired, apoptosis occurs.

(b) Mutated p53



Mutated p53 does not arrest the cell cycle. The damaged cell continues to divide, which may result in cancer.

Ρόλος p53

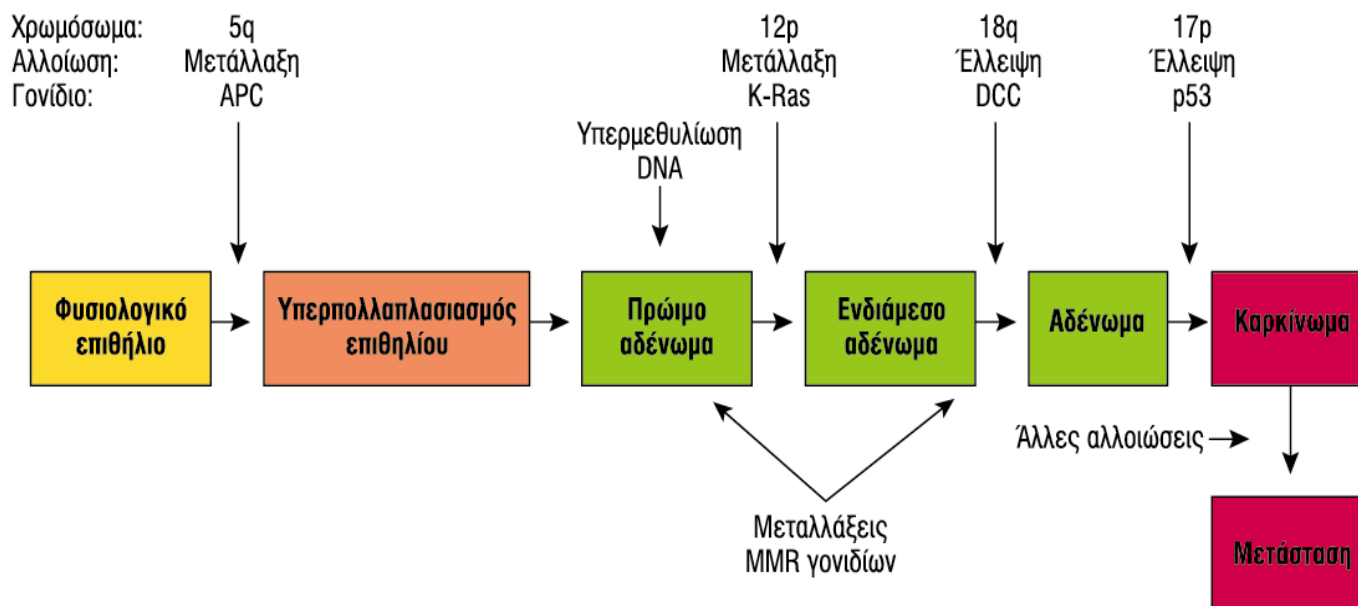


Ογκοκατασταλτικά γονίδια και καρκινικά σύνδρομα

Καρκινικό σύνδρομο	Γονίδιο	Πρωτογενής όγκος	Κυτταρική εντόπιση	Ρόλος
Li-Fraumeni	p53	σαρκώματα, όγκοι μαστού και εγκεφάλου	πυρήνας	μεταγραφικός παράγων, ρυθμιστής μεταγραφής
Ρετινοβλάστωμα	Rb	ρετινοβλάστωμα, οστεοσάρκωμα	πυρήνας	ρυθμιστής μεταγραφής
FAP	APC	καρκίνος παχέος εντέρου	κυτταρό-πλασμα	κυτταρική προσκόλληση
Καρκίνος Wilm	WT-1	νεφροβλάστωμα	πυρήνας	μεταγραφικός παράγων
Οικογενής Καρκίνος Μαστού	BRCA1 BRCA2	καρκίνος μαστού, ωθηκών καρκίνος μαστού	πυρήνας	μεταγραφικός παράγων
Οικογενές μελάνωμα	p16	μελάνωμα	πυρήνας	αναστολέας CDKs
Καρκίνος παχέος εντέρου	DCC	καρκίνος παχέος εντέρου	μεμβράνη	κυτταρική προσκόλληση
HNPCC	hMSH2 hMLH1 hPMS1 hPMS2	καρκίνος παχέος εντέρου	πυρήνας	επιδιόρθωση λανθασμένου ζευγαρώματος

Πολυσταδιακή διαδικασία Καρκινογένεσης

Μοντέλο Vogelstein

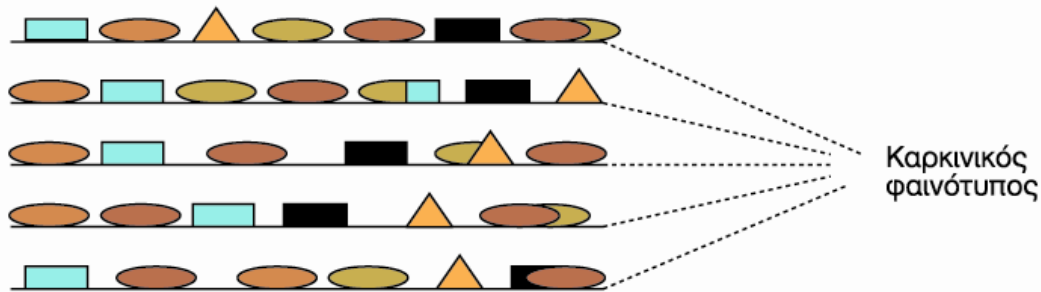








Γενετικό μοντέλο του Vogelstein για την εξήγηση της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο.

Η καρκινογένεση είναι αποτέλεσμα τόσο γενετικών αλλοιώσεων όπου εμπλέκονται ογκογονίδια (π.χ. K-Ras) και αντι-ογκογονίδια (p53, APC, DCC) όσο και επιγενετικών αλλοιώσεων (π.χ. μεταβολή της μεθυλίωσης του DNA). Τα τρία στάδια του αδενώματος αντιστοιχούν σε όγκους αυξανόμενου μεγέθους, δυσπλασίας και θηλώδους περιεχομένου. Αλλοιώσεις σε ογκογονίδια, αντι-ογκογονίδια ή και μεταβολή της μεθυλίωσης μπορεί να οδηγήσουν σε μικρό αδένωμα. Επιπλέον μετάλλαξη σ' αυτό οδηγεί σε αδένωμα πιο μεγάλο και πιο δυσπλαστικό. Σε επόμενα στάδια συχνά συναντούμε ελλείψεις αντι-ογκογονιδίων. Δείχθηκε ότι είναι η συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων παρά η σειρά τους που φαίνεται να είναι κρίσιμη για τον καρκινικό μετασχηματισμό. Επιπλέον αλλοιώσεις στο καρκίνωμα οδηγούν σε μεταστατικούς όγκους. MMR είναι γονίδια που ευθύνονται για την επιδιόρθωση λαθών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA και αλλοιώσή τους οδηγεί σε συσσώρευση μεταλλάξεων.

Κρίσιμα χτυπήματα

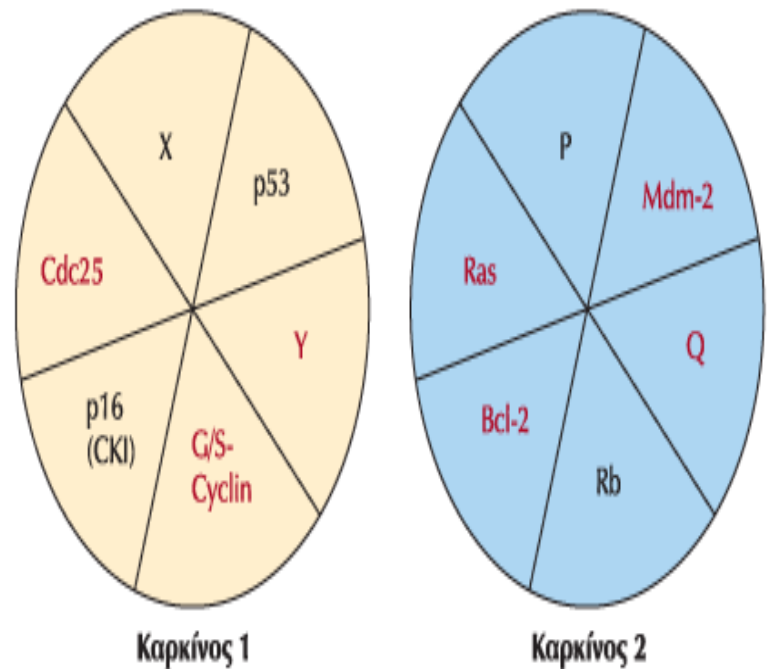
ΒΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ



-  Ενεργοποίηση σημάτων αύξησης
-  Απενεργοποίηση σημάτων καταστολής της αύξησης
-  Αποφυγή απόπτωσης
-  Αθανασία
-  Νεο-αγγειογένεση
-  Ικανότητα διήθησης / μετάστασης

ΕΙΚΟΝΑ 25.20

Κάθε καρκίνος έχει ένα διαφορετικό πρότυπο ενεργοποιημένων πρωτοογκογονιδίων και απενεργοποιημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα ογκογονίδια χρωματίζονται ερυθρά και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια χρωματίζονται μαύρα. Τα X, Y, P, και Q είναι μη ταυτοποιημένα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια που είναι μεταλλαγμένα σε ένα συγκεκριμένο όγκο.



Μεθυλίωση στον υποκινητή ενός γονιδίου

μεταγραφική
καταστολή
(πλήρης ή μερική)



Λευκά οβάλ: Αμεθυλιωτές κυτοσίνες

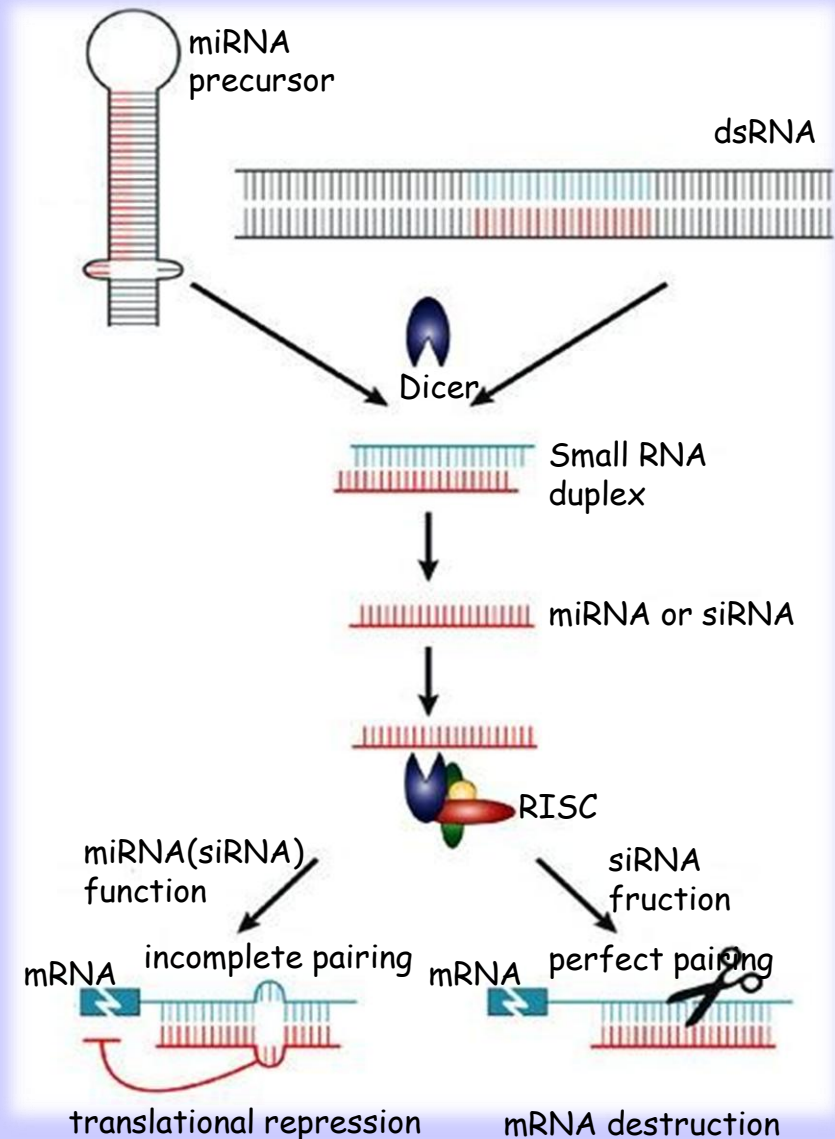
Κόκκινα οβάλ: Μεθυλιωμένες κυτοσίνες

MicroRNA (miRNAs)

- μικρές περιοχές RNA με μήκος 21-23 νουκλεοτίδια
- δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες
- ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση καταστέλλοντας τη ρύθμιση των ογκογονιδίων
- Η έκφρασή τους σχετίζεται με την ταξινόμηση, διάγνωση, σταδιοποίηση και εξέλιξη του όγκου, καθώς επίσης με την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία

Παραδείγματα για το ρόλο των microRNA στην παθοφυσιολογία του καρκίνου:

miR-15a and **miR-16-1** τα οποία έχουν διαγραφεί ή είναι απορρυθμισμένα στις περισσότερες περιπτώσεις χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας



Το γενετικό μοντέλο καρκινογένεσης:

Γενετικές διαταραχές (μεταλλάξεις, απαλείψεις, μετατοπίσεις γονιδίων) οδηγούν στην καρκινογένεση

Το επιγενετικό μοντέλο καρκινογένεσης:

Επιγενετικές διαταραχές στην έκφραση γονιδίων συμμετέχουν στην καρκινογένεση



Μελέτη Καρκινογένεσης

- Ογκογονίδια και αντιογκογονίδια

Τρόποι πρόκλησης βλαβών στο DNA από επίδραση περιβαλλοντικών και ενδογενών παραγόντων

- Μελέτη κυτταρικής αύξησης , ιστικής ανανέωσης και γήρανσης. Πρωτείνες ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου.

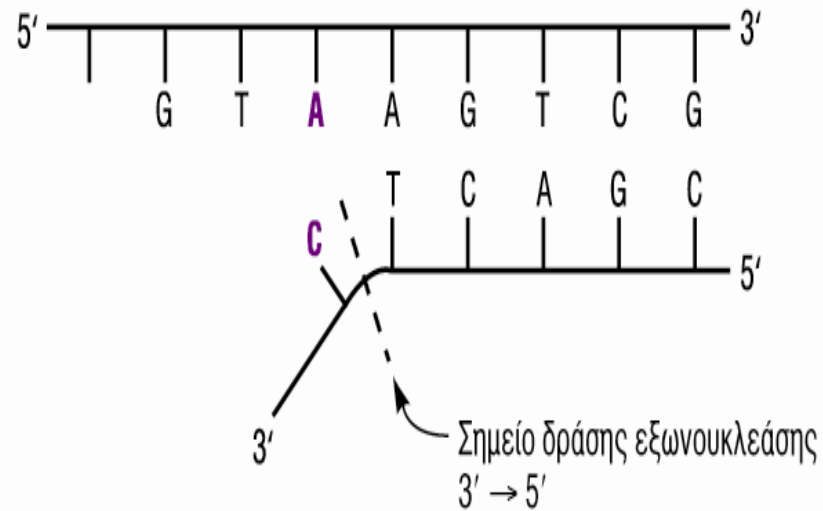
Μελέτη ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σημάτων

Βλάβες στο DNA και μηχανισμοί επιδιόρθωσης

- DNA πρέπει να παραμένει σταθερό από γενιά σε γενιά.
- Ημισυντηρητική αντιγραφή / μηχανισμός αλάθητος?
- Λάθη αντιγραφής
- Περιβάλλον / μεταλλαξογόνα / ΒΛΑΒΕΣ.
- Μη επιδιόρθωση βλαβών οδηγεί σε ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Βλάβες οφειλόμενες σε λάθη της αντιγραφής

- Αντιγραφή πιστή αλλά λόγω ταχύτητας λάθη.
- **Γλύστρημα πολυμεράσης** αφήνει αζευγάρωτες βάσεις στον πατρικό κλώνο και έτσι εισάγονται λάθη (DNA replication slippage).
- **Proofreading Pol δεν επιδιορθώνει** και έτσι λάθος ζεύγος, σύνηθες φαινόμενο MM. Μπορεί να επιδιορθωθεί αργότερα MMR.



Δράση 3' → 5' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης I

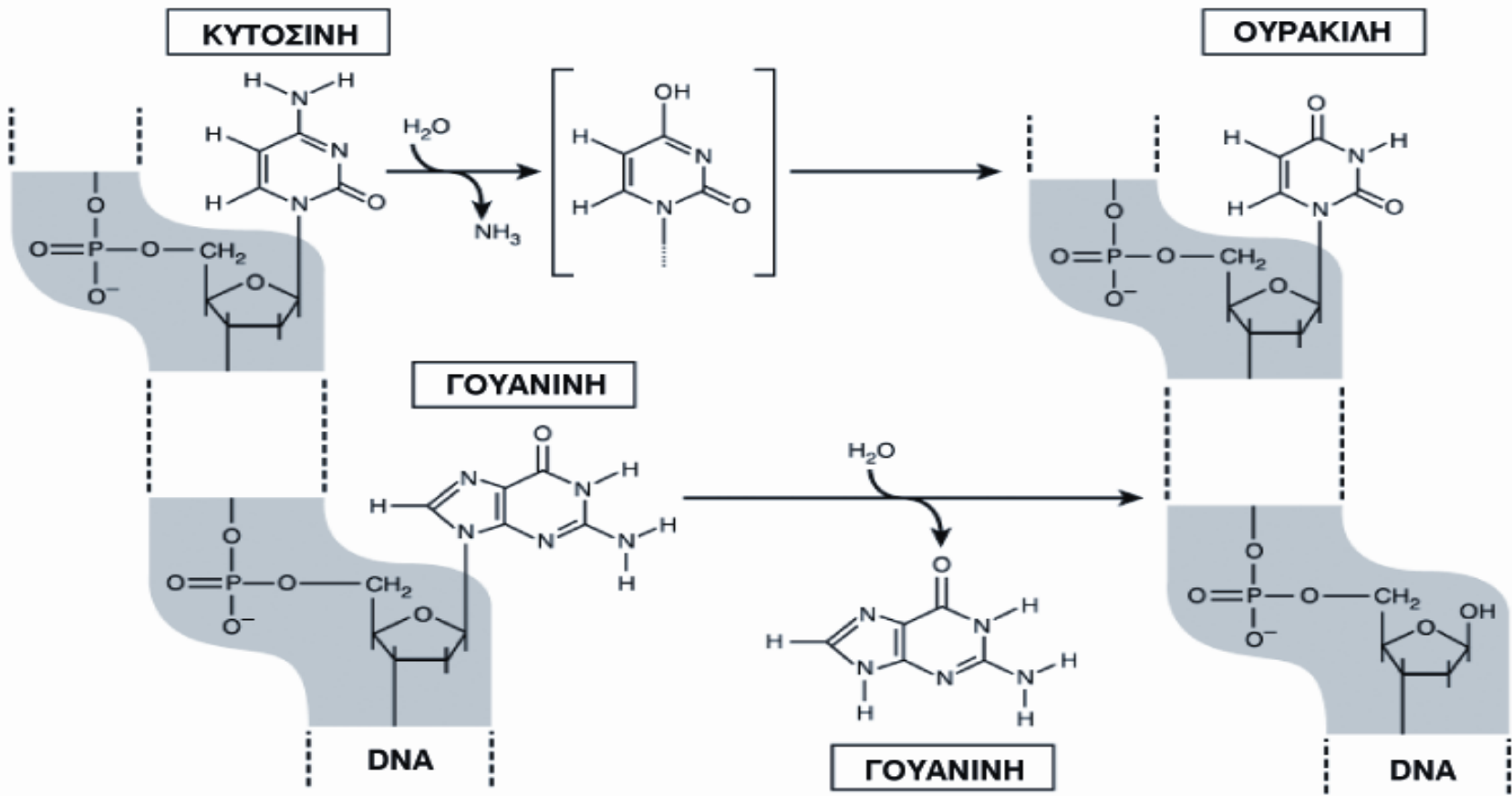
Η κυτοσίνη δεν μπορεί να ζευγαρώσει με την αδενίνη και αποκόπτεται.

Πρόκληση βλαβών στο DNA

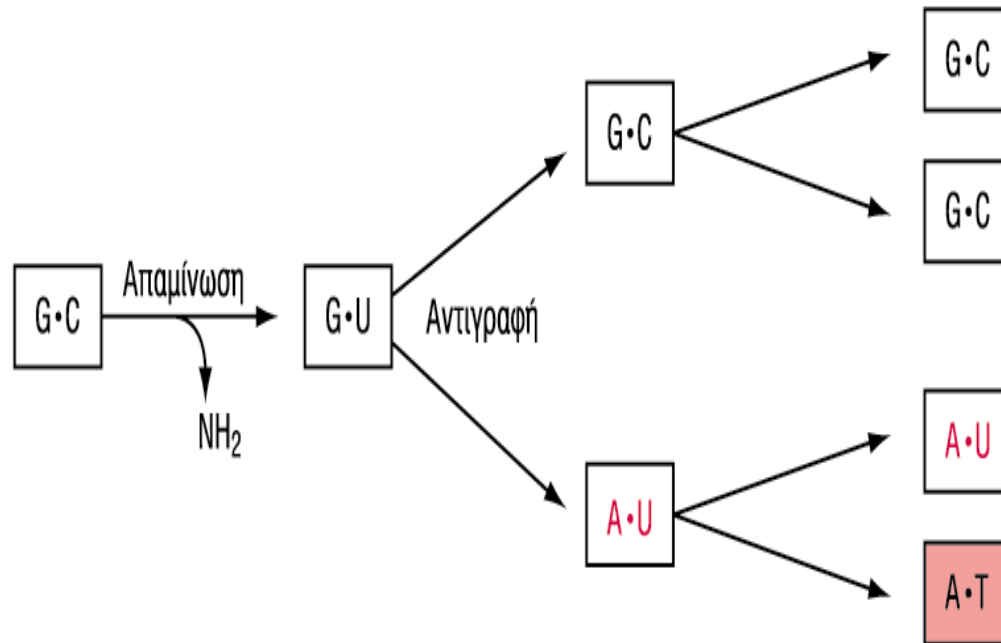
Βλάβες οφειλόμενες σε περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες

- Προκλητές (χημικά – ακτινοβολίες-θερμοκρασία) και
- Αυθόρμητες όπως
- Ταυτομερίωση
- Απαμίνωση
- Αποπουρίνωση

Ανω-Απαμίνωση της κυτοσίνης την μετατρέπει σε

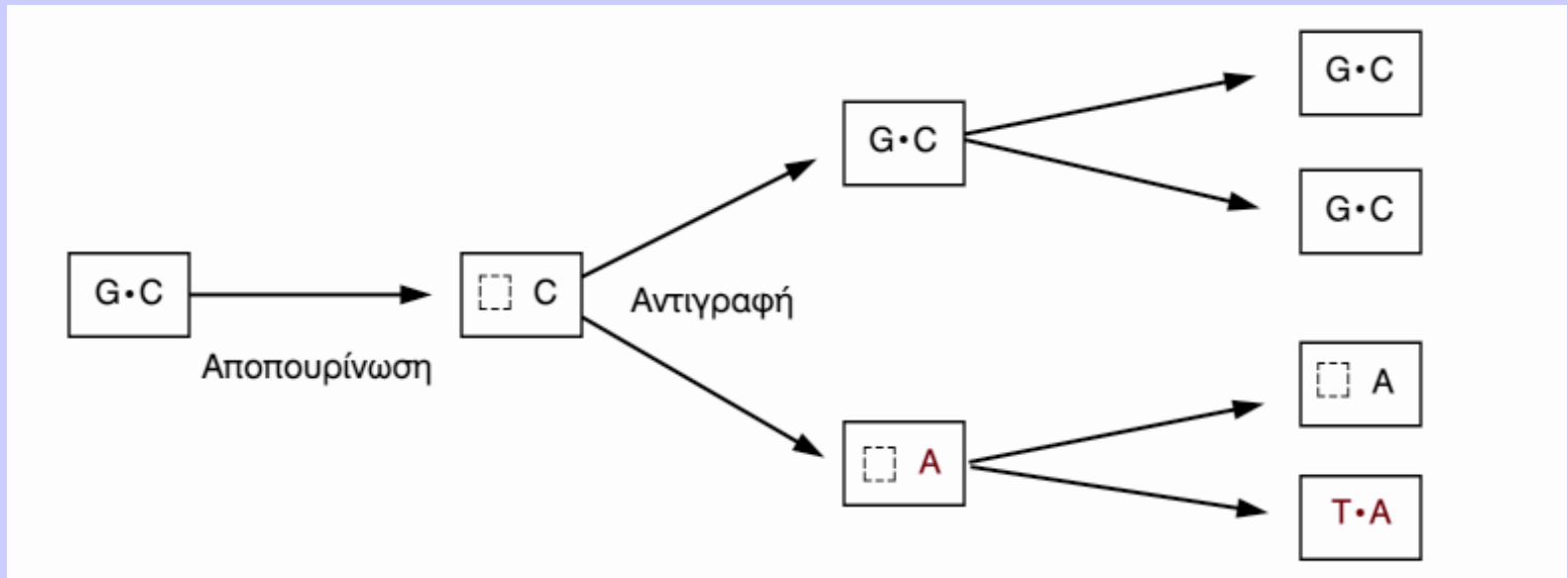


- Κάτω- αποπουρίνωση της Γουανίνης



Πρόκληση μετάπτωσης (G-C → A-T) λόγω απαμίνωσης της κυτοσίνης και μετατροπής της σε ουρακίλη.

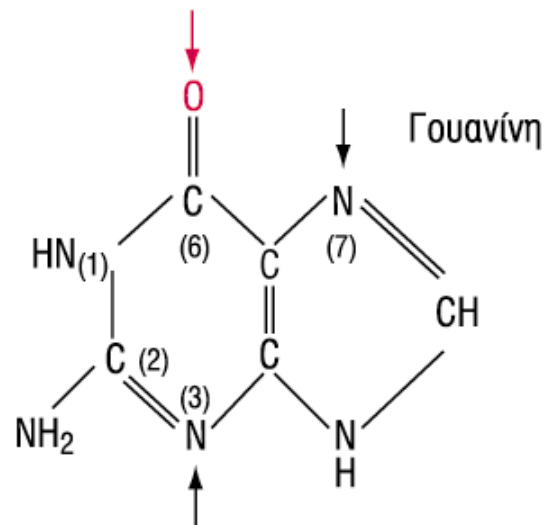
Πρόκληση Μεταστροφής



- Προστίθεται Αδενίνη όταν η DNA Pol συναντάει μία απουρινική θέση

Πρόκληση βλαβών στο DNA

- Εξωτερικής προέλευσης



Θέσεις αντίδρασης αλκυλιωτικών παραγόντων με τη γουανίνη.

Με κόκκινο βέλος σημειώνεται η θέση O-6 της γουανίνης η οποία έχει μεγάλη βιολογική σημασία καθώς είναι όχι μόνο προμεταλλαξογόνος αλλά και προκαρκινογόνος. Με μαύρα βέλη οι τοξικές βλάβες στο N7 και N3 της γουανίνης.

Πειράματα Barbacid

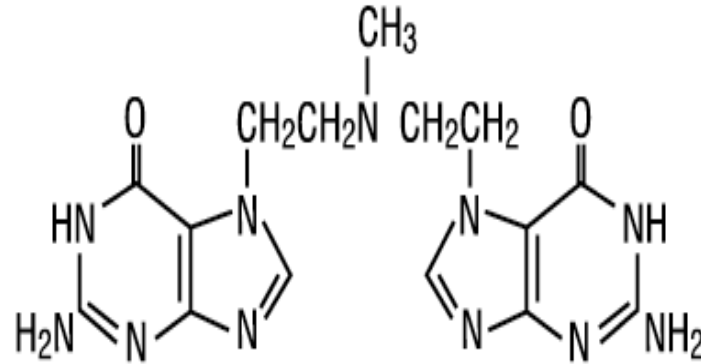
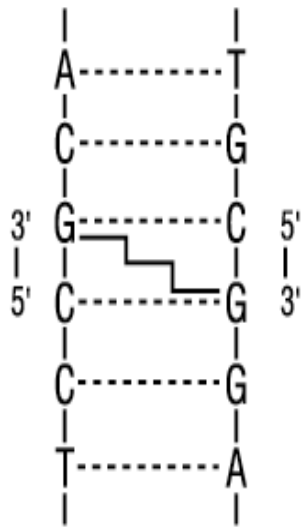
- Χορήγηση MNU (methylnitrosourea) σε ποντίκια (96)
- Όλα ανέπτυξαν καρκίνο μαστού.
- Σε όλα βρέθηκε Ras μεταλλαγμένο στο κωδικόνιο 12 ($G \rightarrow A$) στη 2η γουανίνη.
- Κωδικόνιο 12 φυσιολογικό GGC

Εξήγηση

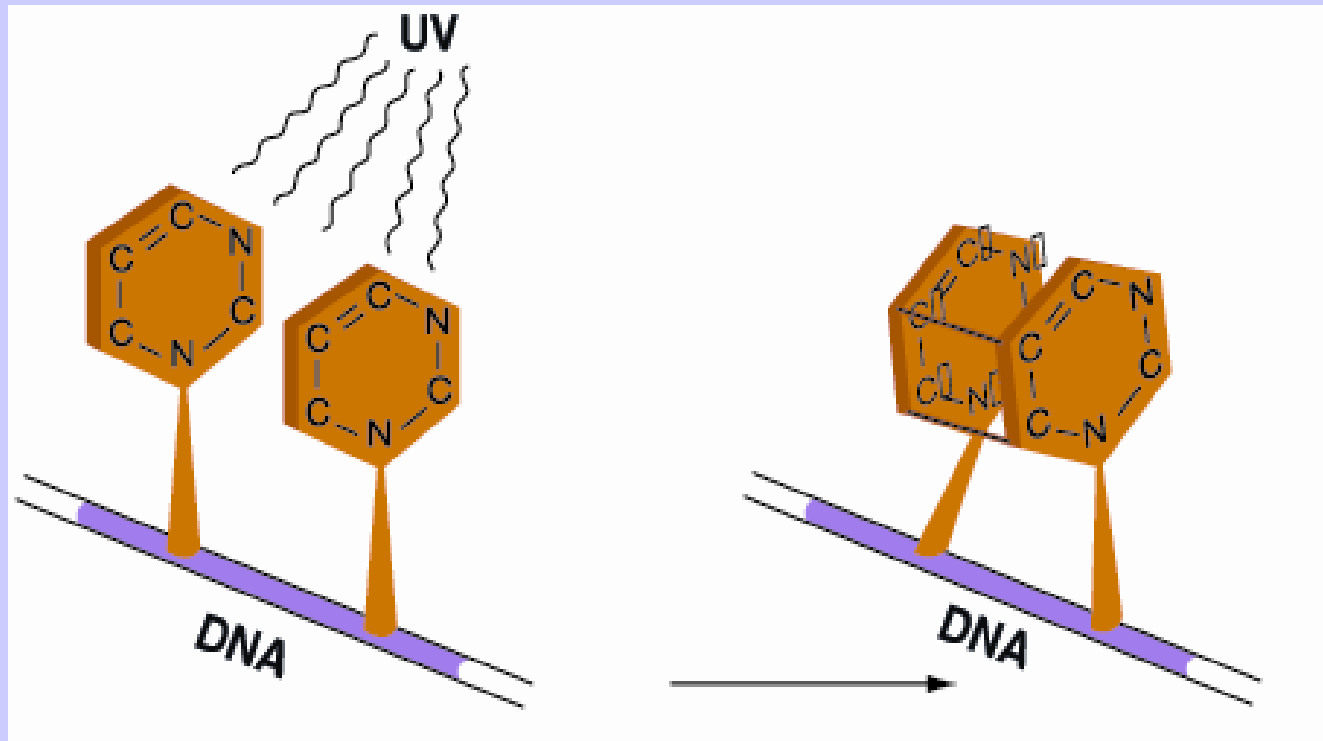
- $G \rightarrow A$ λόγω μεθυλίωσης γουανίνης στο O6
- mG ζευγαρώνει με T.
- $T \rightarrow A$
- Εξήγηση μετάλλαξης
- Από το είδος μετάλλαξης μπορούμε να καταλάβουμε την ουσία που προκάλεσε τη μετάλλαξη.

Γιατί η 2η γουανίνη ;

- Μελέτες έδειξαν ότι η 2η G επιδιορθώνεται πιο δύσκολα/ πρώτη.
- Μπορεί και η **στερεοδιαμόρφωση** του DNA να ευθύνεται για τη δύσκολη επιδιόρθωση.



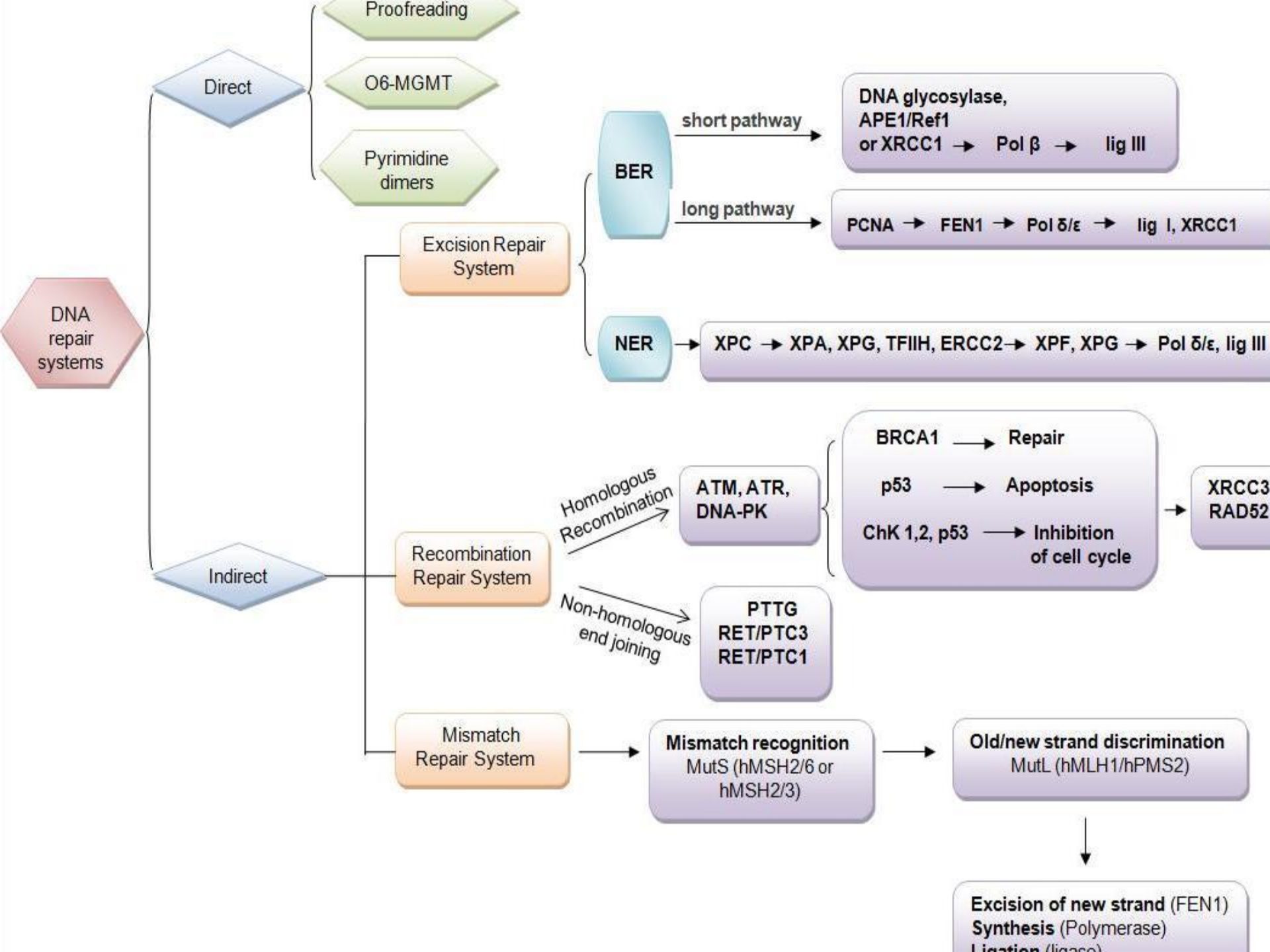
Δράση αλκυλιωτικών ουσιών ως κυτταροστατικών. Σταυροδεσμοί που αναπτύσσονται από αλκυλιωτικές ουσίες μεταξύ των δύο κλώνων του DNA. Λόγω ανάπτυξης ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ δύο γουανινών οι κλώνοι του DNA δεν «ανοίγουν» για την αντιγραφή με αποτέλεσμα τη χρήση των αλκυλιωτικών ουσιών ως κυτταροστατικών φαρμάκων.



- Δημιουργούνται υπό την επίδραση UV ακτινοβολίας

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

- Αμεσοι
- Εμμεσοι

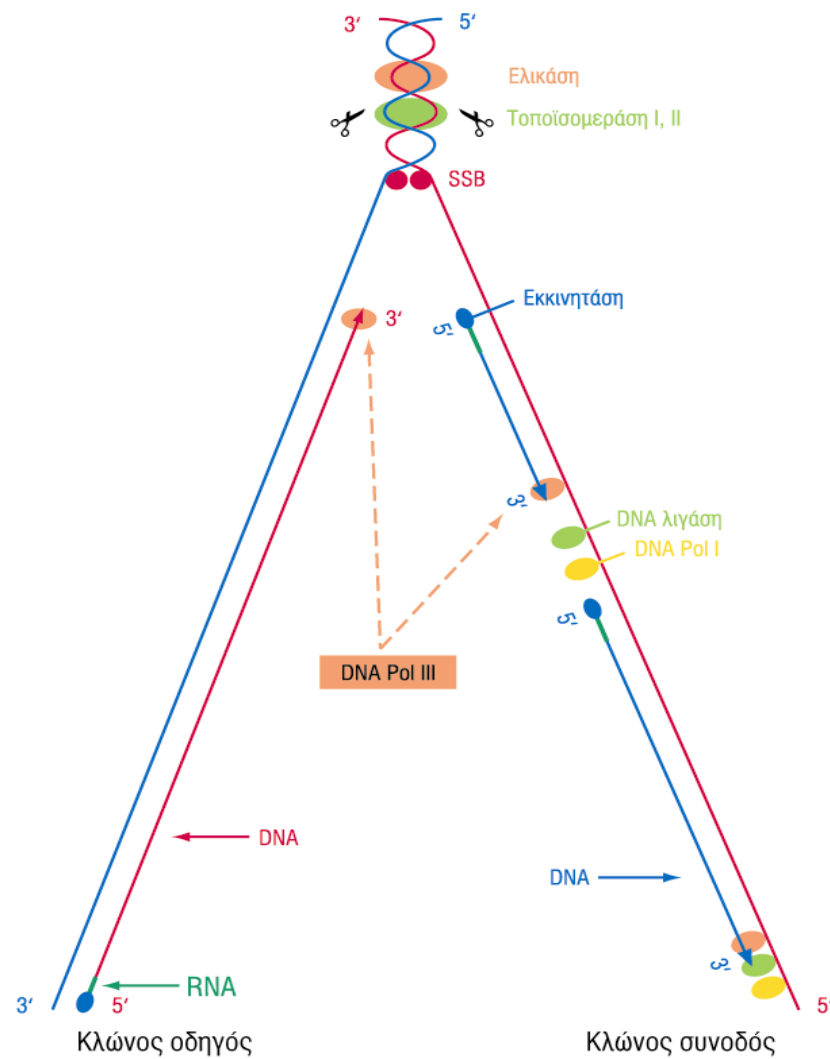


Άμεση Επιδιόρθωση

Επιδιόρθωση της O-6 αλκυλο
γουανίνης

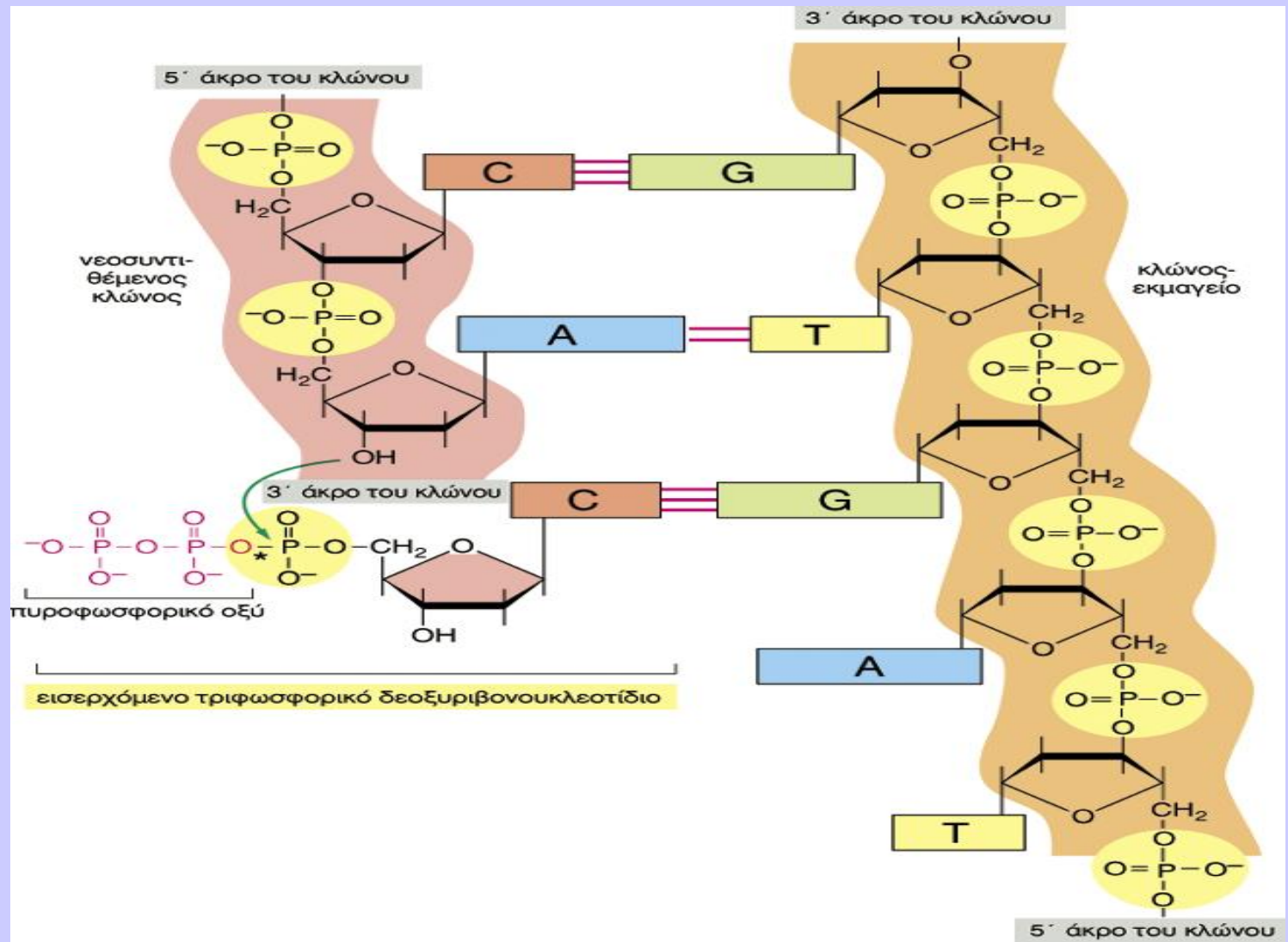
Διμερή T-T φυτά / βακτήρια
φωτολύαση

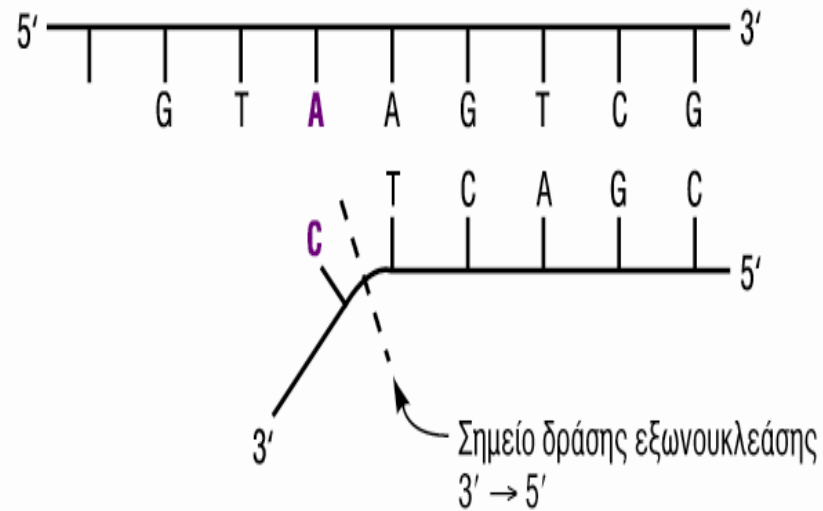
DNA pol 3' - - >5' exonuclease



Αντιγραφή δίκλωνου DNA στα προκαρυωτικά

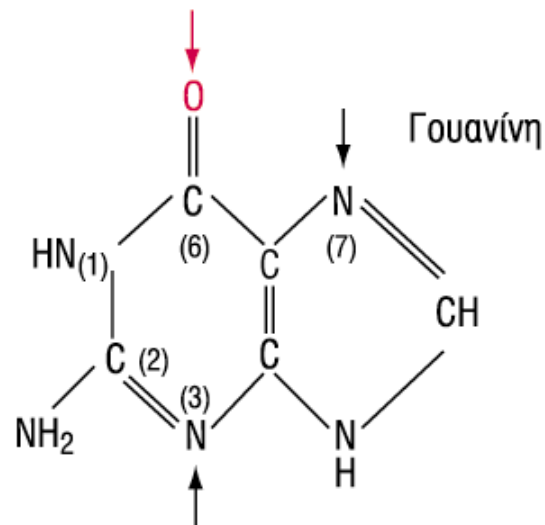
Ο κλώνος οδηγός συντίθεται κατά συνεχή τρόπο από την DNA πολυμεράση III ενώ ο κλώνος συνοδός συντίθεται κατά τμήματα Okazaki από το ίδιο ένζυμο. Τα ένζυμα ελικάσες ξετυλίγουν το δίκλωνο DNA, οι τοποϊσομεράσες I και II χαλαρώνουν το DNA από την υπερελίκωση τέμνοντας και επανασυνδέοντάς τον ένα ή και τους δύο κλώνους αντίστοιχα ενώ οι ssb πρωτεΐνες εμποδίζουν την επανασύνδεση του δίκλωνου DNA. Η εκκινητάση συνθέτει ένα ολιγομερές RNA το οποίο επιμηκύνεται από τη DNA πολυμεράση III. Η DNA πολυμεράση I υδρολύει το RNA και συνθέτει στη θέση του DNA ενώ η DNA λιγάση αποκαθιστά τη συνέχεια του κλώνου συνδέοντας τα κομμάτια Okazaki μεταξύ τους.





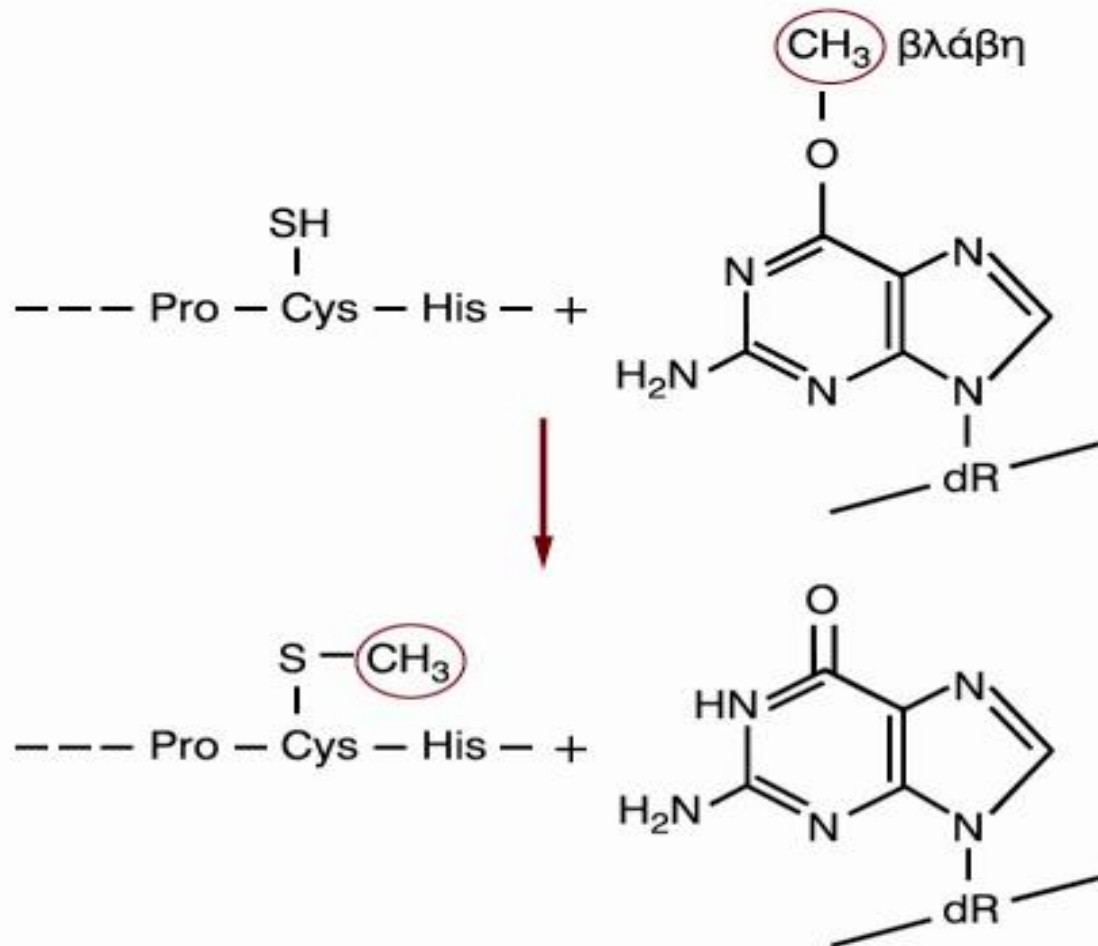
Δράση 3' → 5' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης I

Η κυτοσίνη δεν μπορεί να ζευγαρώσει με την αδενίνη και αποκόπτεται.



Θέσεις αντίδρασης αλκυλιωτικών παραγόντων με τη γουανίνη.

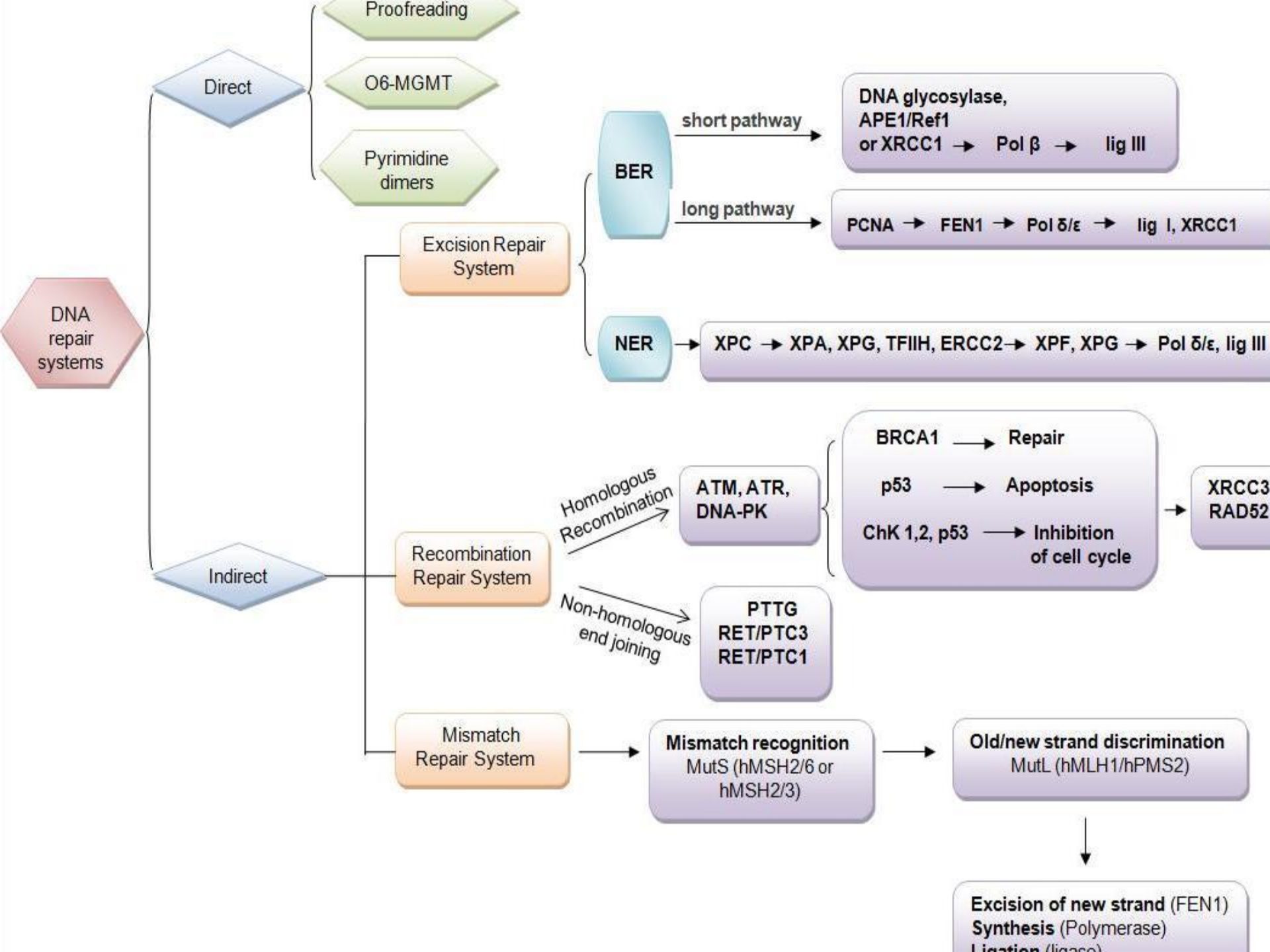
Με κόκκινο βέλος σημειώνεται η θέση O-6 της γουανίνης η οποία έχει μεγάλη βιολογική σημασία καθώς είναι όχι μόνο προμεταλλαξογόνος αλλά και προκαρκινογόνος. Με μαύρα βέλη οι τοξικές βλάβες στο N7 και N3 της γουανίνης.

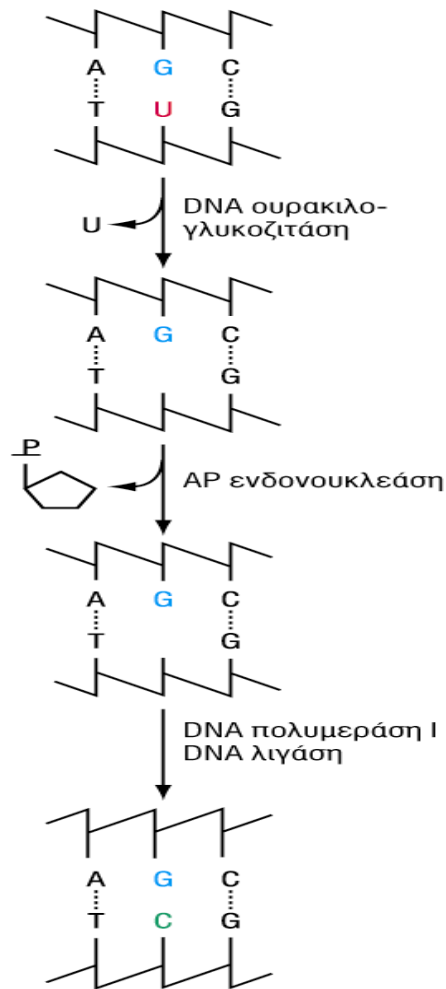


- Η μεθυλοτρανσφεράση της O⁶-Mg
- Μηχανισμός αυτοκτονίας
- Μέτρηση ενζύμου για θεραπεία με αλκυλιωτικά

Μηχανισμοί Εμμεσης Επιδιόρθωσης

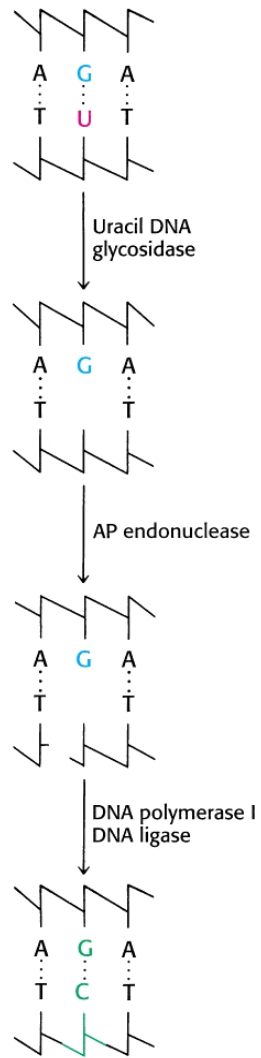
1. Επιδιόρθωση με εκτομή ολιγονουκλεοτιδίου
2. Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης
3. Επιδιόρθωση λανθασμένων ζευγών (MMR)
4. Επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό

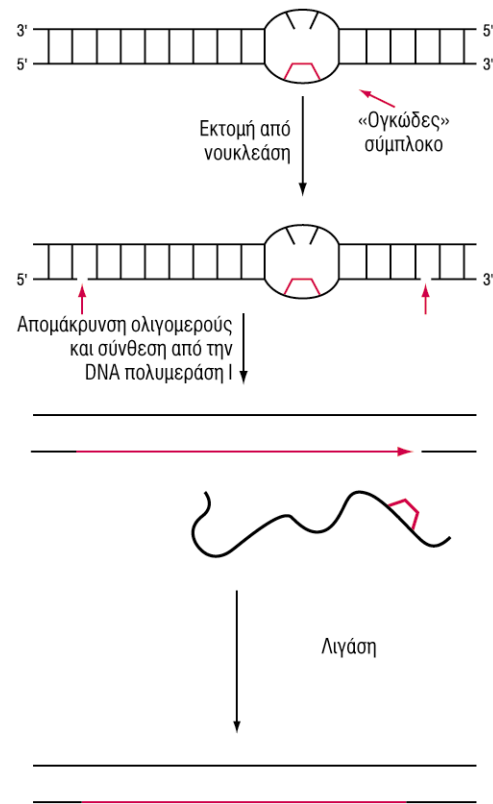




Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης.

Η απαμίνωση της κυτοσίνης οδηγεί σε ουρακίλη. Μία ειδική ουρακιλογλυκοζιτάση υδρολύει τον N-γλυκοζιτικό δεσμό δημιουργώντας μια απυριμιδινική θέση AP. Ακολούθως μια AP ενδονουκλεάση αφαιρεί τη φωσφορική δεσοξυριβόζη και στη συνέχεια η DNA πολυμεράση I με βάση την απέναντι βάση G τοποθετεί τη σωστή C και η λιγάση «σφραγίζει» το κενό ολοκληρώνοντας την επιδιόρθωση.

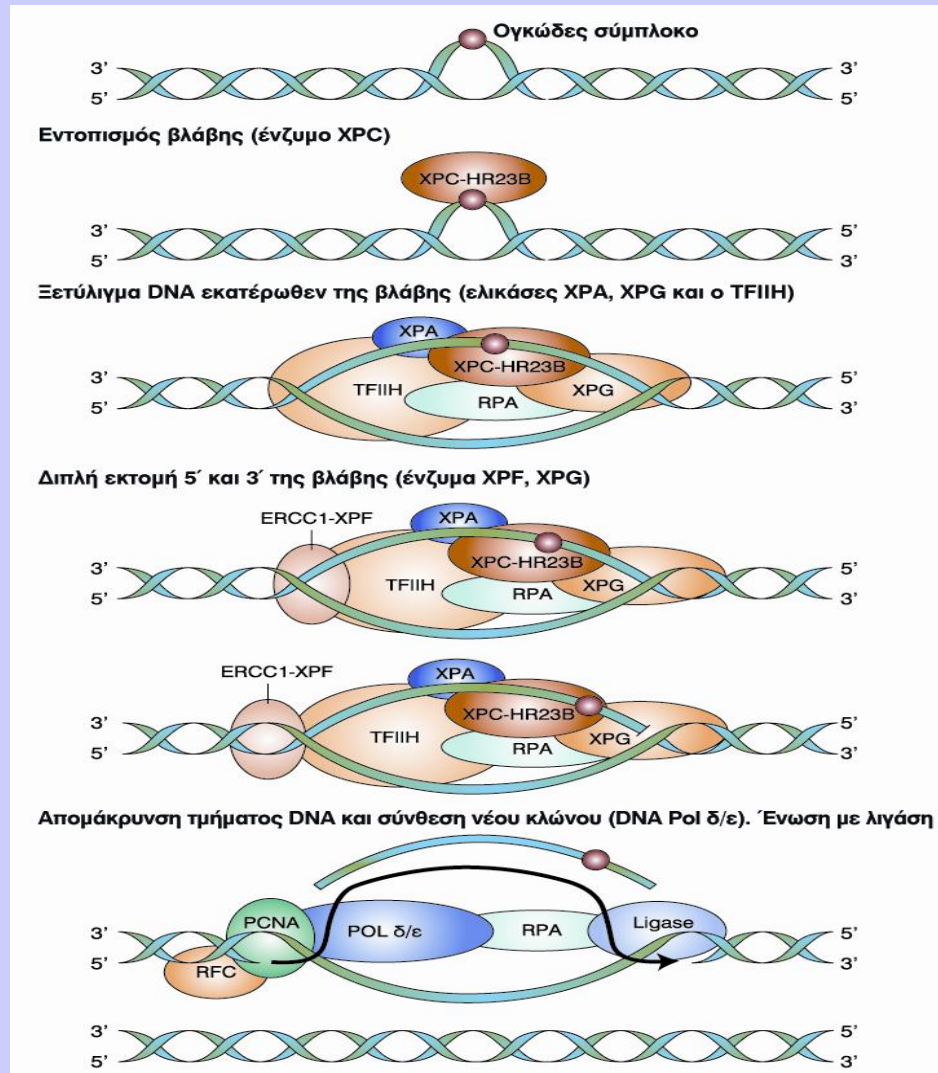




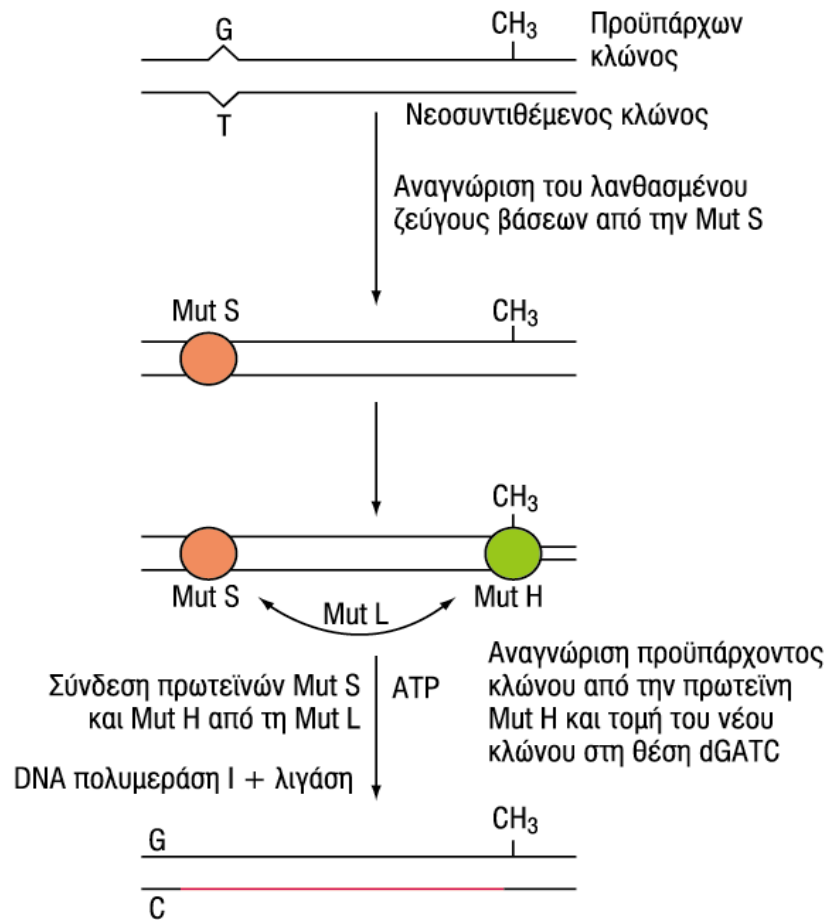
Επιδιόρθωση συμπλόκου με εκτομή ολιγονουκλεοτιδίου.

Πρόκειται για γενικό μηχανισμό επιδιόρθωσης όπου οι αλλοιωμένες βάσεις απομακρύνονται από το DNA ως ολιγονουκλεοτίδιο. Το κενό γεμίζει από την δράση της DNA πολυμεράσης I και «σφραγίζεται» από την DNA λιγάση. Χαρακτηριστικό του μηχανισμού αυτού η μεγάλη ποικιλία υποστρώματος (διμερή θυμίνης, ογκώδη συμπλοκα).

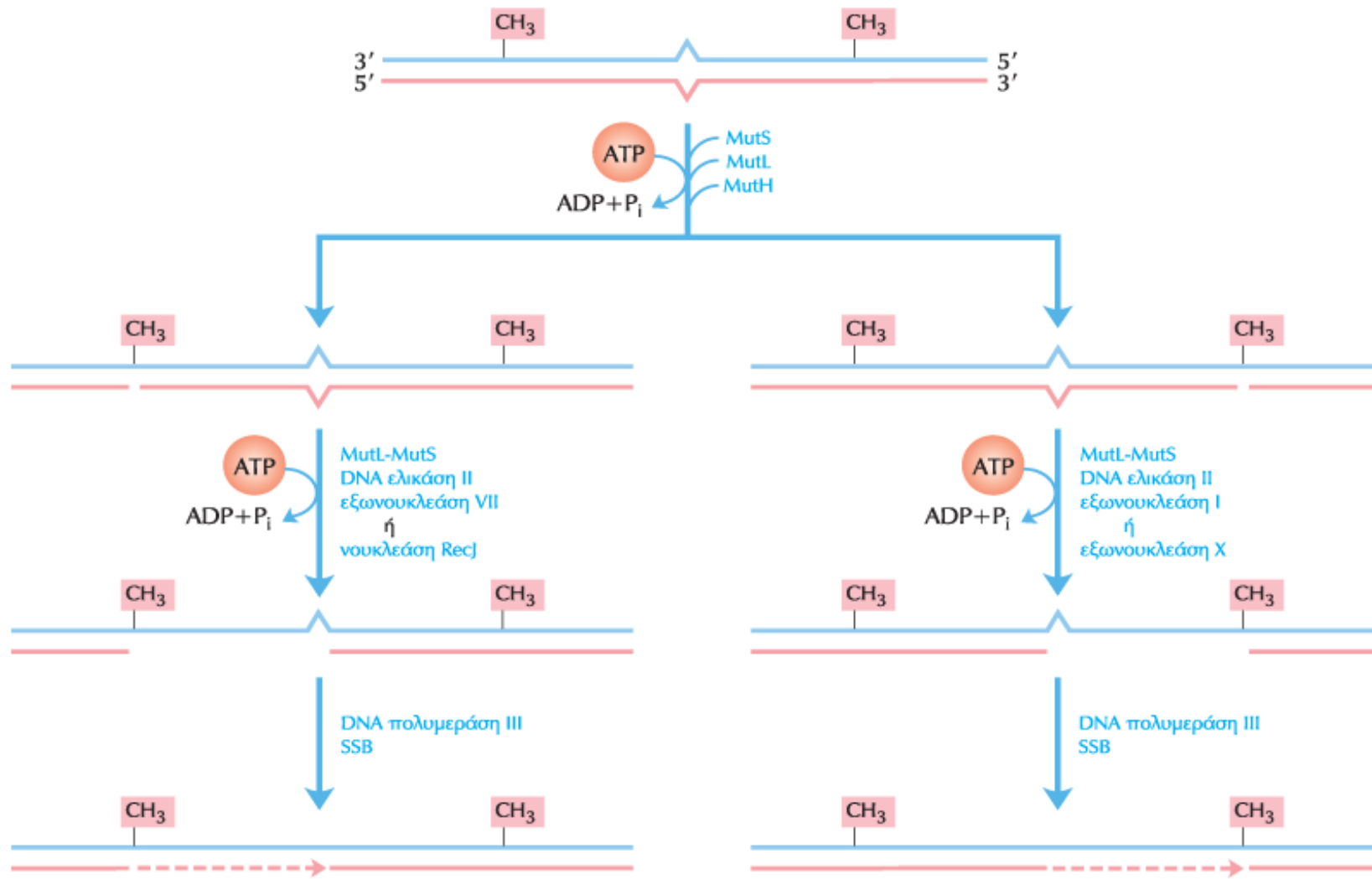
Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων - NER



- Απομακρύνει ογκώδη σύμπλοκα πχ T-T



Επιδιόρθωση λανθασμένου ζεύγους βάσεων (MMR). Η φυσιολογικά μεθυλιωμένη αλληλουχία dGATC επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ προϋπάρχοντος και νεοσυντιθέμενου κλώνου. Ακολουθεί τομή του νέου κλώνου στην αμεθυλιώτη θέση dGATC και επιδιόρθωση κατά τα γνωστά από τη DNA πολυμεράση I και τη λιγάση.



ΕΙΚΟΝΑ 25-22 Ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης των αταίριαστων ζευγών που κατευθύνεται από μεθυλίωση. Η συνδυασμένη δράση της DNA ελικάσης II, της SSB και μιας από τέσσερις διαφορετικές εξωνουκλεάσες αφαιρεί ένα τμήμα του νέου κλώνου ανάμεσα στο σημείο κοπής από τη MutH και ένα σημείο αμέσως μετά το αταίριαστο ζεύγος. Η εξωνουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί επιλέγεται με κριτήριο την εντόπιση της θέσης κοπής σε σχέση προς το αταίριαστο ζεύγος. Το παραγόμενο κενό γεμίζει από τη DNA πολυμεράση III και η εντομή «σφραγίζεται» από τη DNA λιγκάση (δεν εικονίζεται).

Μικροδορυφορικό DNA

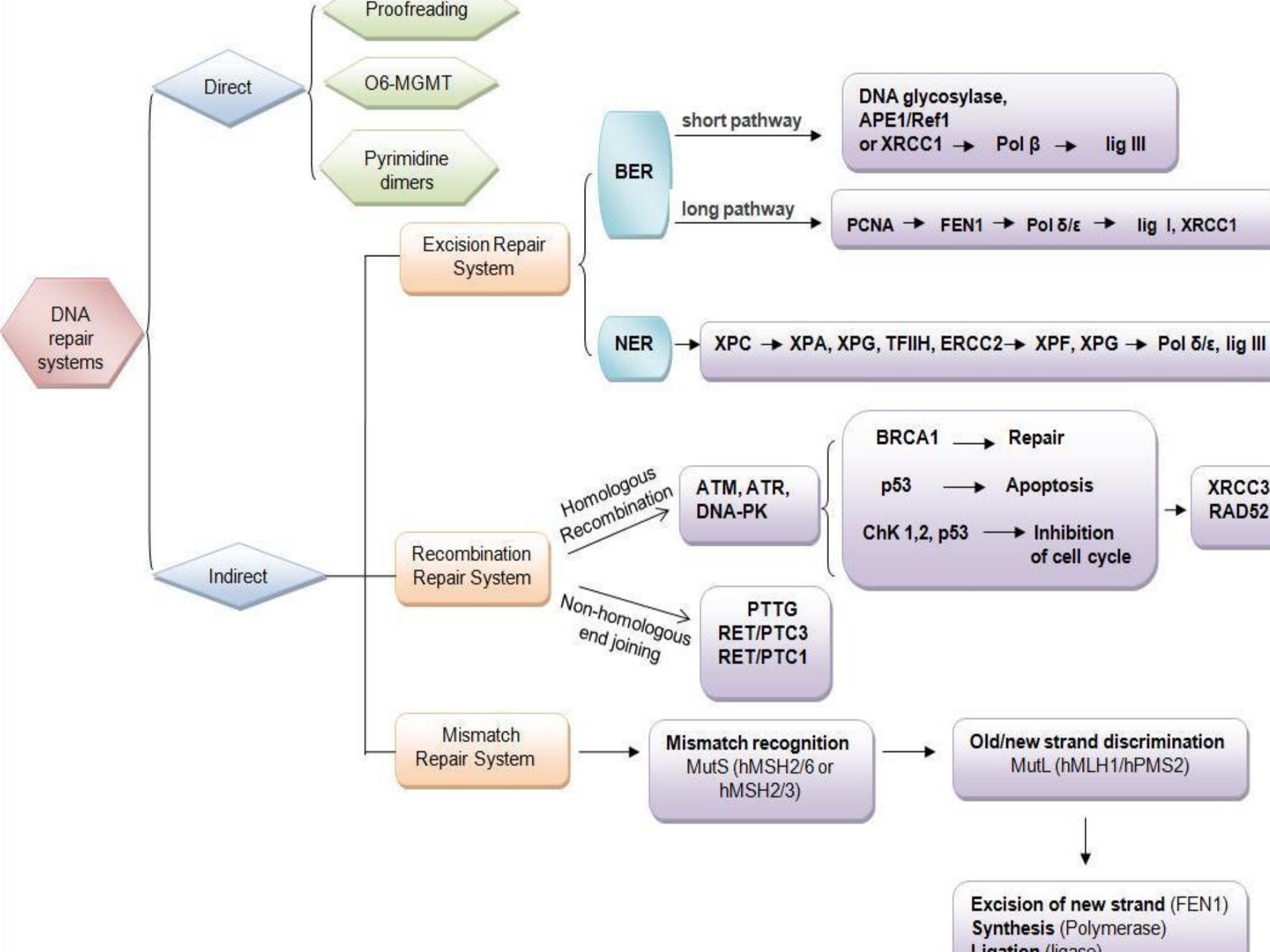
Αφορά περιοχές με επαναλήψεις δι, τρι
τετρανουκλεοτιδίων

Εχει βρεθεί ότι άτομα με ελαττωματικό μηχανισμό
MMR συσσωρεύουν μεταλλάξεις. Αυτή η
συσσώρευση ονομάζεται αστάθεια
μικροδορυφορικού DNA και είναι

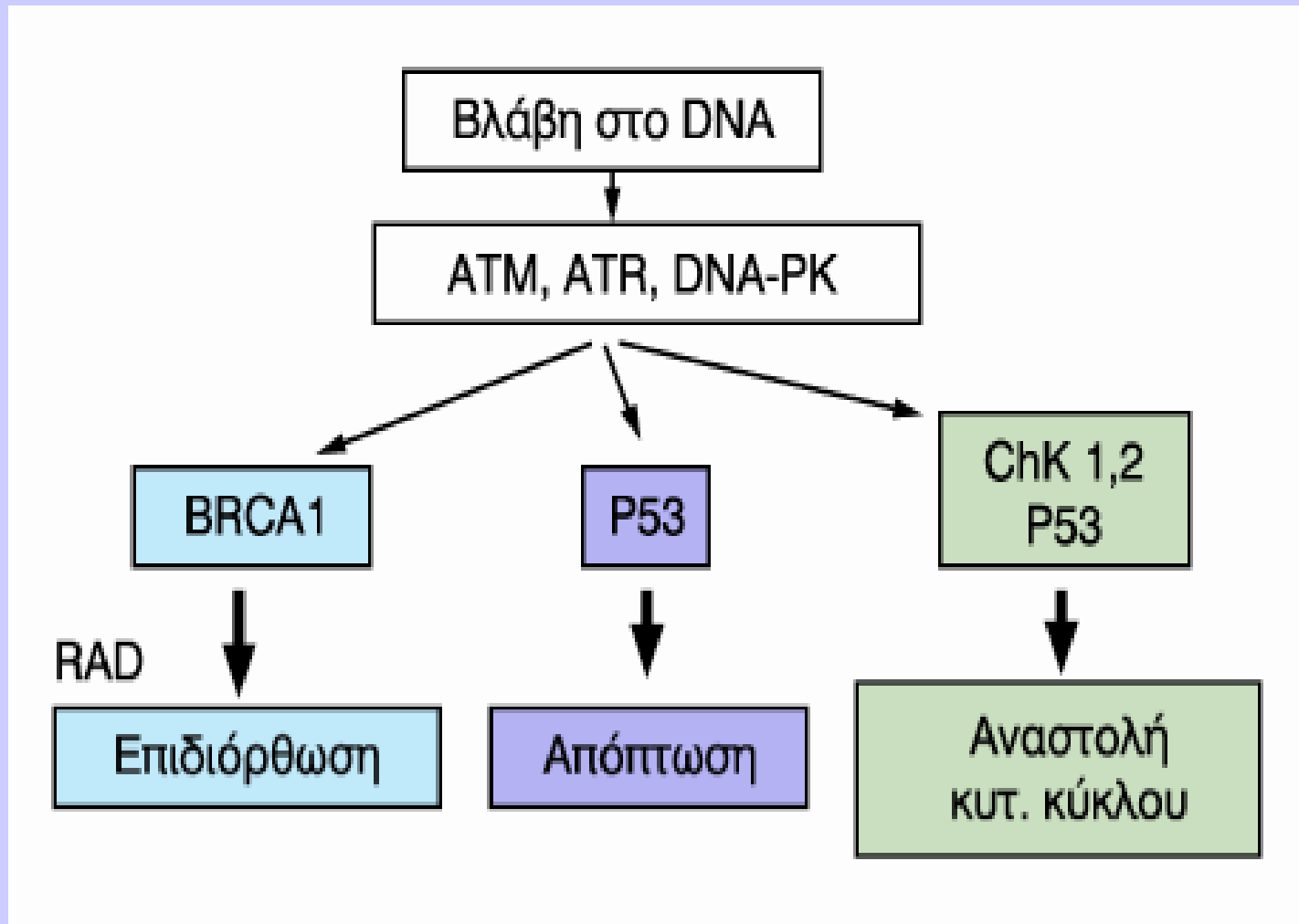
μία ένδειξη για την ύπαρξη ελαττωματικού MMR

Συσσωρευση λαθών

- Και σε άλλα τμήματα του γονιδιώματος.
- Αυξημένη αστάθεια έχει βρεθεί σε αρκετές περιπτώσεις με σποραδικό καρκίνο παχέος εντέρου, μαστού, ωοθηκών...
- Αυτό υποδηλώνει ότι το MMR είναι σημαντικός μηχανισμός στη καρκινογένεση.



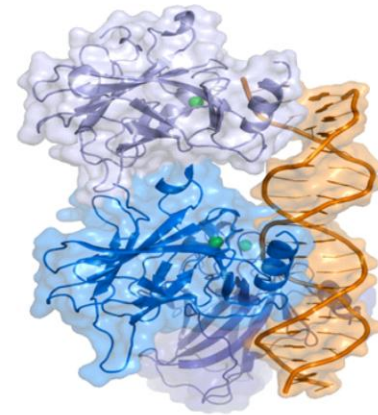
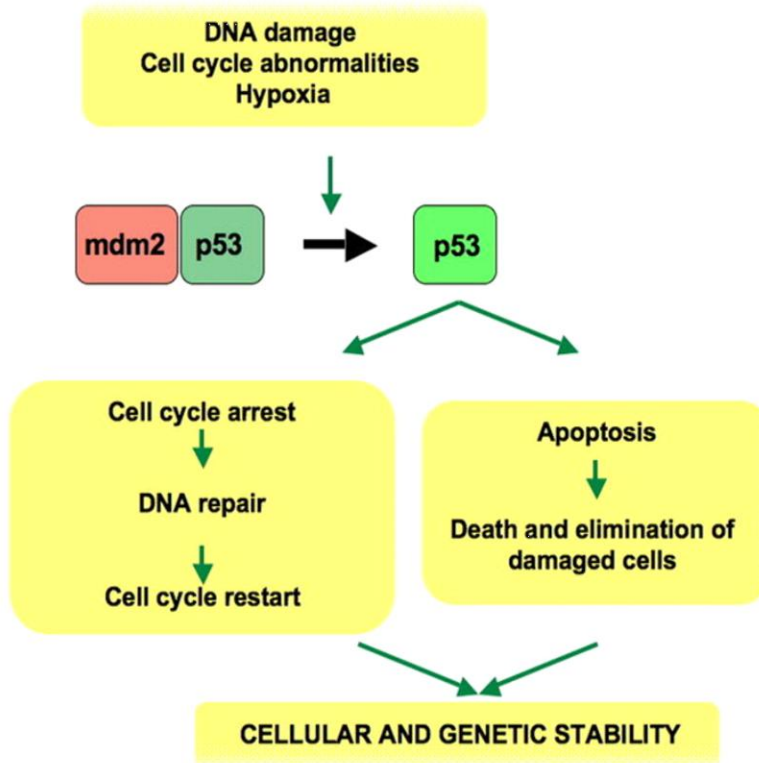
Η διπλή θραύση αλυσίδων DNA κινητοποιεί μηχανισμούς για stop ΚΚ και αντιμετώπισης με ομόλογο ανασυνδυασμό.



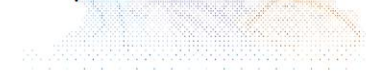
Ρόλος p53

- Έλεγχος DNA και stop αν βλάβη για επιδιόρθωση.
- Αν δεν γίνει επιδιόρθωση βλάβης η p53 οδηγεί σε **απόπτωση**.

p53 “ο φρουρός του γονιδιώματος”

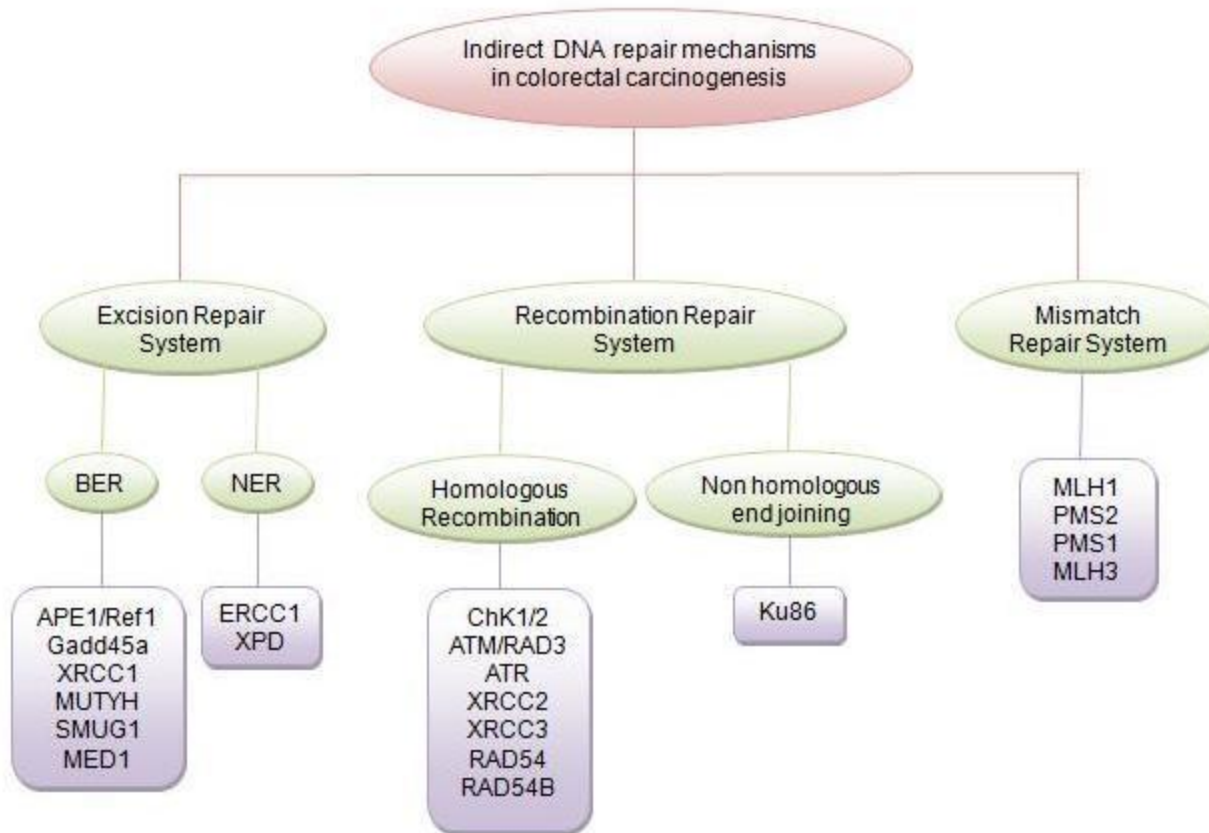


p53 3-D structure



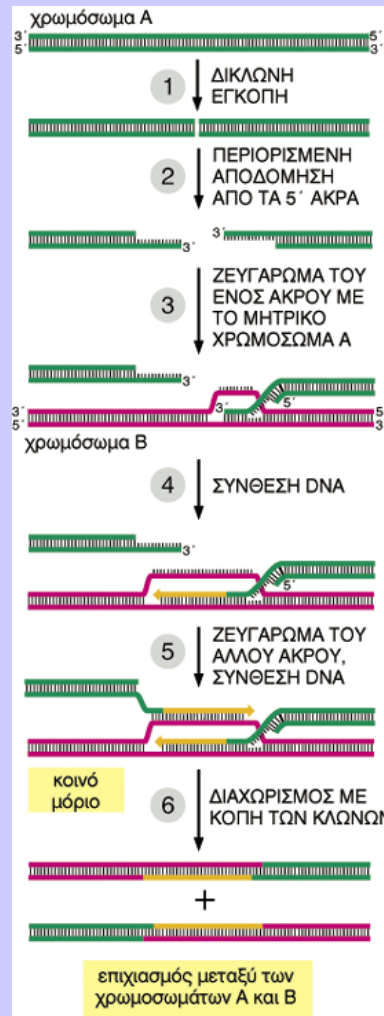
Απόπτωση

Προγραμματισμένος κυτταρικός
θάνατος



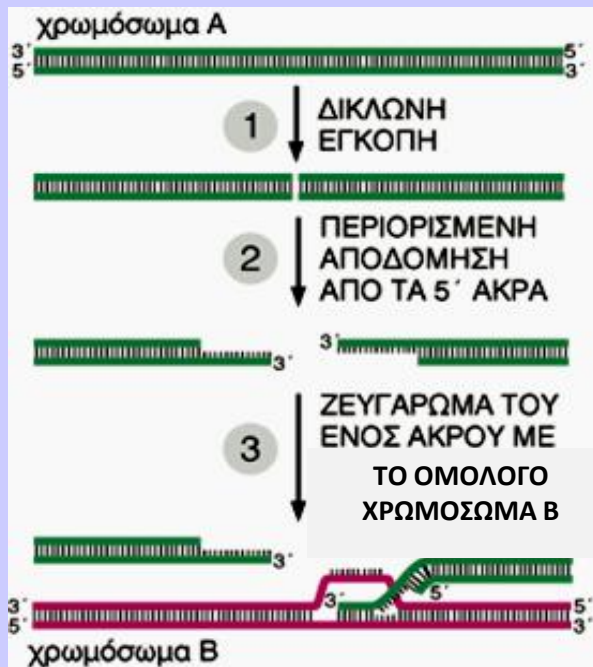
Μοντέλο του Holiday

Αφορά επιδιόρθωση βλαβών και στις δύο αλυσίδες του DNA **ΑΝ Υπάρχει διπλασιασμένο χρωμόσωμα** (μετά τη φάση S)

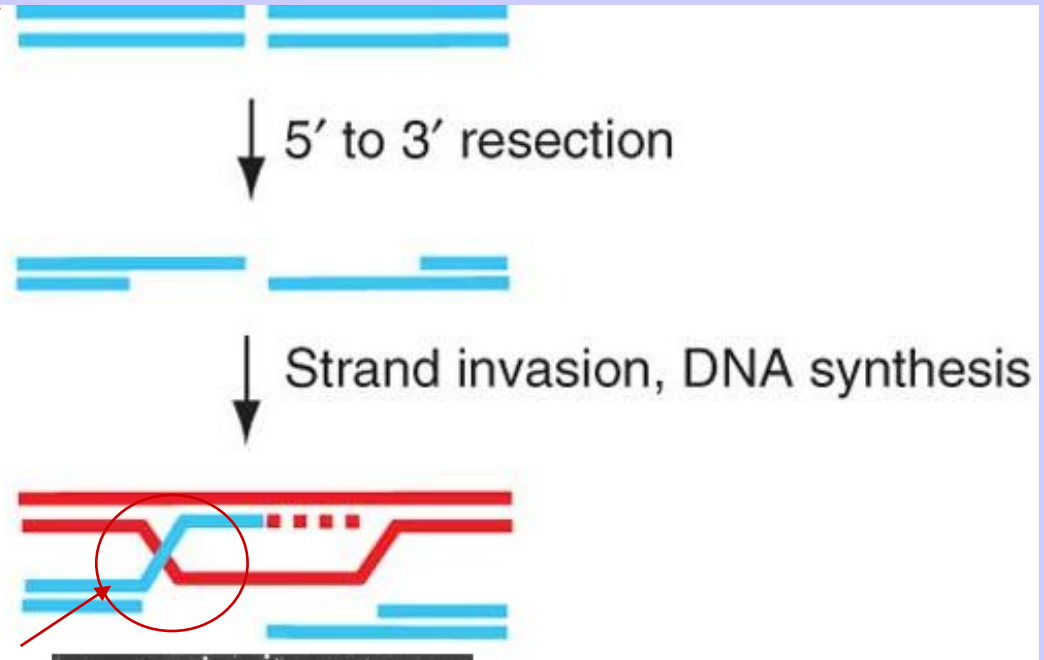


ΟΜΟΛΟΓΟΣ ανασυνδυασμός: πώς γίνεται?

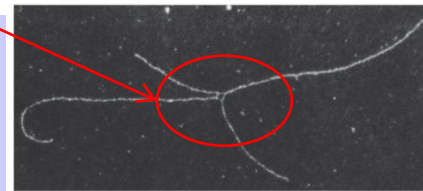
I) αρχικά στάδια



Δημιουργία
διπλής
θραύσης

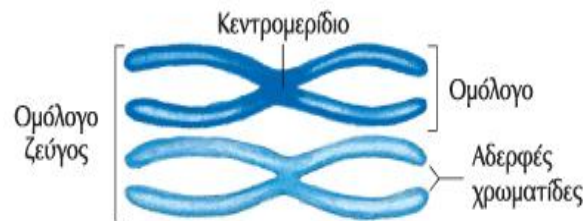


Σχηματισμός
δομής Holliday

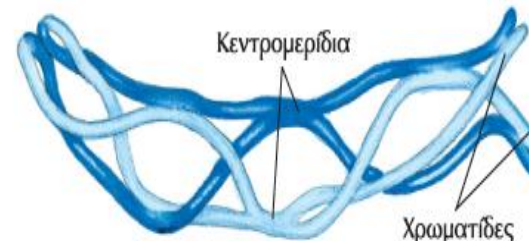


δομή Holliday: δημιουργείται με επιχiasμό

ανάμεσα σε μία 'χρωματίδη' από κάθε ομόλογο τμήμα (χρωμόσωμα)



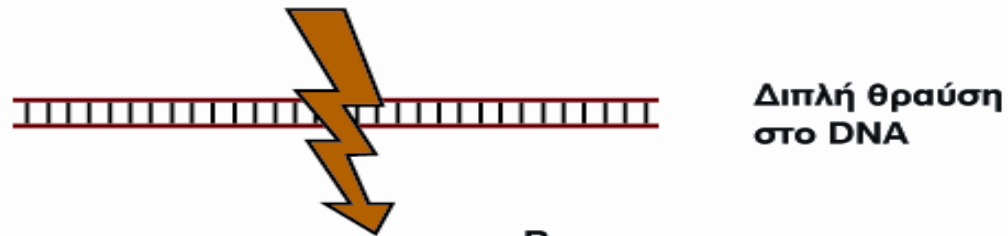
(α)



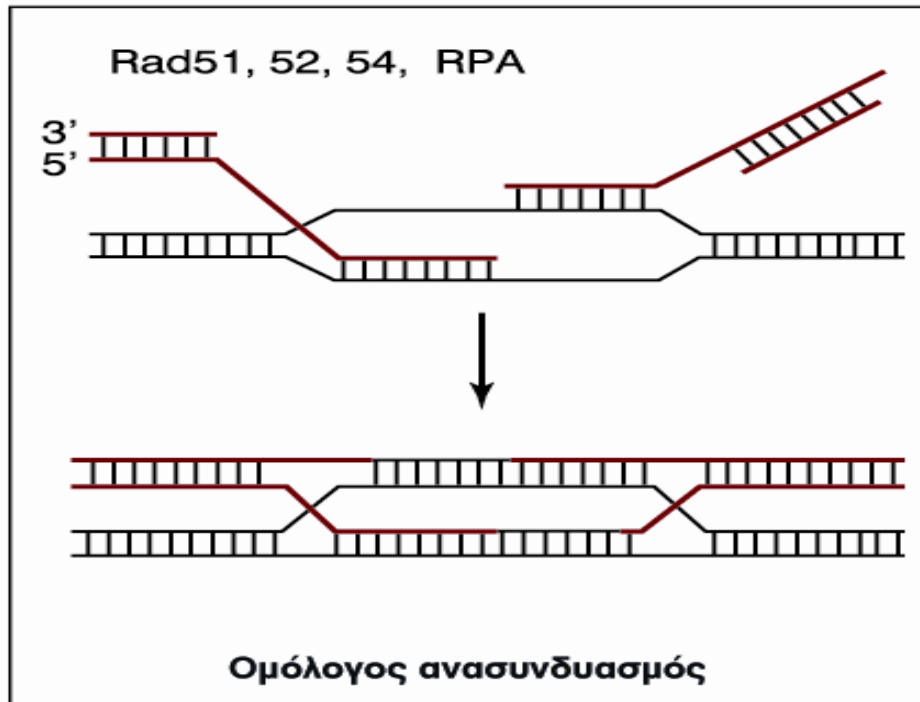
(β)

ΕΙΚΟΝΑ 25-30 Επιχιασμός. (α) Ο επιχιασμός συχνά επιφέρει ανταλλαγή γενετικού υλικού. (β) Τα ομόλογα χρωμοσώματα μιας ακρίδας κατά την πρόφαση I της μείωσης. Μεταξύ των δύο ομόλογων ζευγών χρωματίδων παρατηρούνται πολλά σημεία ένωσης (χιάσματα). Αυτά τα χιάσματα είναι η φυσική εκδήλωση προηγηθέντων συμβάντων ομόλογου ανασυνδυασμού (επιχιασμού).

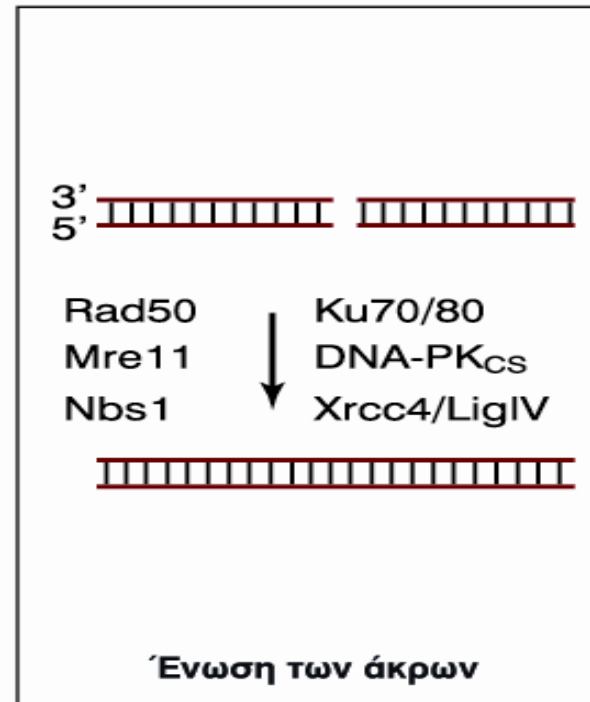
Επιδιόρθωση διπλής θραύσης. Α με ομόλογο ανασυνδυασμό και Β με ένωση κομμένων άκρων

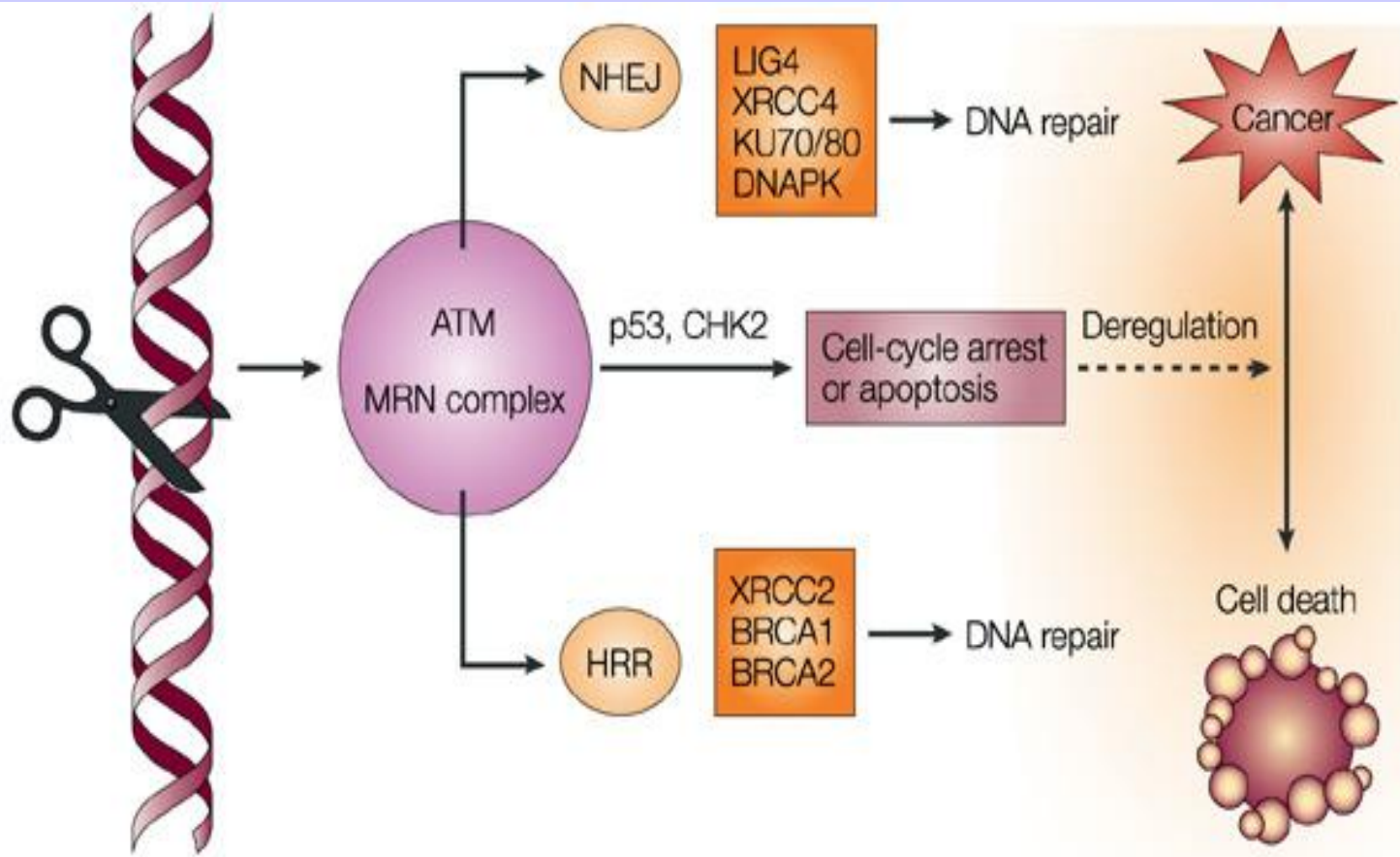


A



B





Παθήσεις οφειλόμενες σε ελλειπή επιδιόρθωση

- Μελαχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum) $uvrabc-$
- Σύνδρομο Bloom (λιγάση -)
- HNPCC (MMR-/mut -)

Ελλειμματική ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΔΙΜΕΡΩΝ ΘΥΜΙΝΗΣ

Μελαγχρωματική ξηροδερμία Xeroderma Pigmentosum

- Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων δε λειτουργεί σωστά
- Ελαττωματική επιδιόρθωση ογκωδών συμπλόκων (διμερών θυμίνης, κ.ά).



- Μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης (XPA -XPG)
- Σοβαρή φωτοευαισθησία
- 1000 φορές αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος και άλλων καρκίνων

Σύνδρομα που οφείλονται σε κληρονομικές παθήσεις που αφορούν ένζυμα επιδιόρθωσης.

NAME	PHENOTYPE	ENZYME OR PROCESS AFFECTED
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	colon cancer	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 d
Ataxia telangiectasia (AT)	leukemia, lymphoma, cellular g-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

Συμπέρασμα Ι

Καρκινογένεση

- Πολυπαραγοντική – πολυσταδιακή διαδικασία
- Μελέτη onc, antionc, μηχανισμών επιδιόρθωσης κ.α, συμβάλλει στη κατανόησή της.
- Χρήση onc, anti-onc ως βιολογικών δεικτών για έγκαιρη διάγνωση και διαφοροποίηση πασχόντων με κριτήρια μοριακά.

Συμπέρασμα II

- Κατανόηση πρόκλησης βλαβών και μεταλλάξεων στο DNA καθώς και των μηχανισμών επιδιόρθωσης αυτών συμβάλλει στη κατανόηση της καρκινογένεσης.

.