

Επιδιόρθωση Βλαβών του DNA

DNA Repair





Πηγές βλαβών του DNA

1. Ενδογενείς βλάβες

Προκαλούνται κατά τη διάρκεια κυτταρικών διαδικασιών όπως η αντιγραφή του DNA και ο μεταβολισμός

2. Εξωγενείς βλάβες

Προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες όπως UV, θερμική διάσπαση ουσιών, τοξίνες, κάπνισμα, χημικά μεταλλαξογόνα



ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ

Σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (checkpoints)

Επιδιόρθωση των βλαβών του DNA

Απόπτωση

Οι βλάβες του DNA διαφέρουν από τις μεταλλάξεις



- **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 του DNA**

Αλλοιώσεις στη δομή του DNA (λάθη της πολυμεράσης, αλλοιώσεις βάσεων, διμερή πυριμιδινών, σπασίματα αλυσίδων DNA, κ.ά.)

Αναγνωρίζονται από ειδικά ένζυμα και μπορούν να επιδιορθωθούν διότι η σωστή πληροφορία είναι διαθέσιμη για αντιγραφή από τη συμπληρωματική αλυσίδα DNA

Είδη βλαβών του DNA

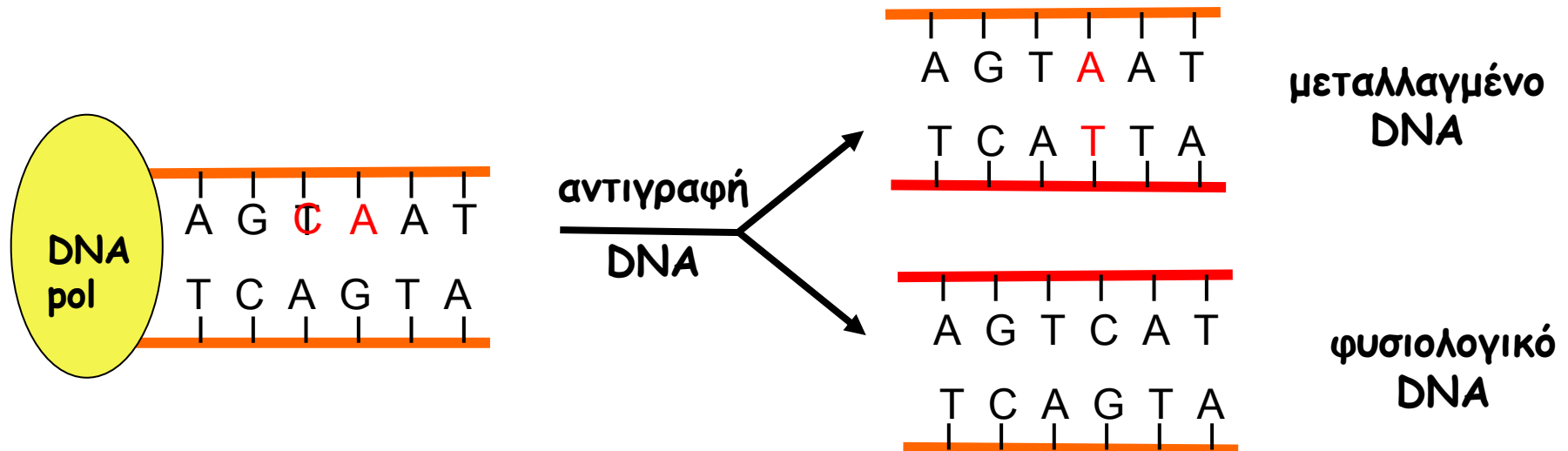
- «Τυπογραφικά» λάθη της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του DNA
- Αλλοιώσεις βάσεων (οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, αποπουρινώσεις, απαμινώσεις)
- Θραύση της μίας αλυσίδας του DNA
- Διμερή πυριμιδινών
- Προσθήκη ογκωδών χημικών μορίων
- Θραύση και των δύο αλυσίδων του DNA



Σφάλματα της DNA πολυμεράσης (mismatch of bases)



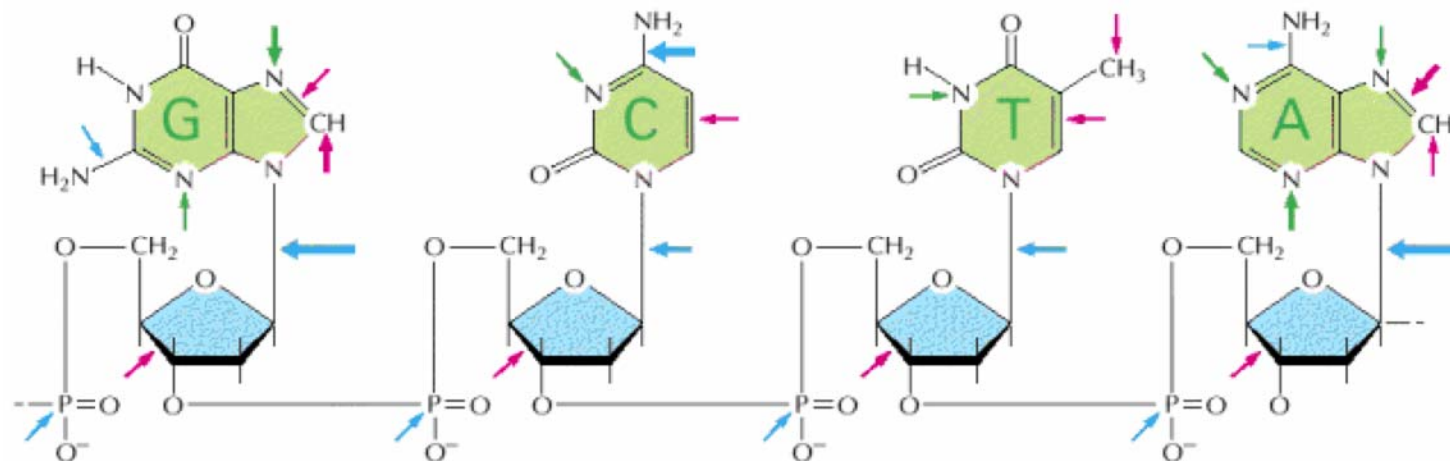
- Προσθήκη 1-4 βάσεων/ απάλειψη 1-4 βάσεων/ εισδοχή μη συμπληρωματικής βάσης. Αποτέλεσμα: αλλαγή στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA (μετάλλαξη)



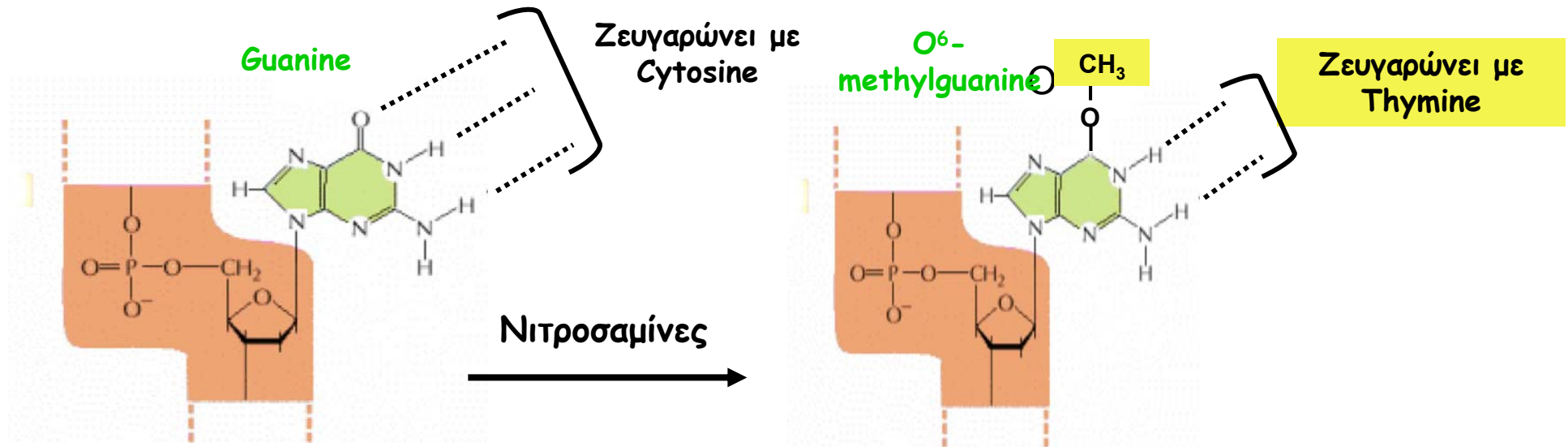
Αλλοιώσεις βάσεων



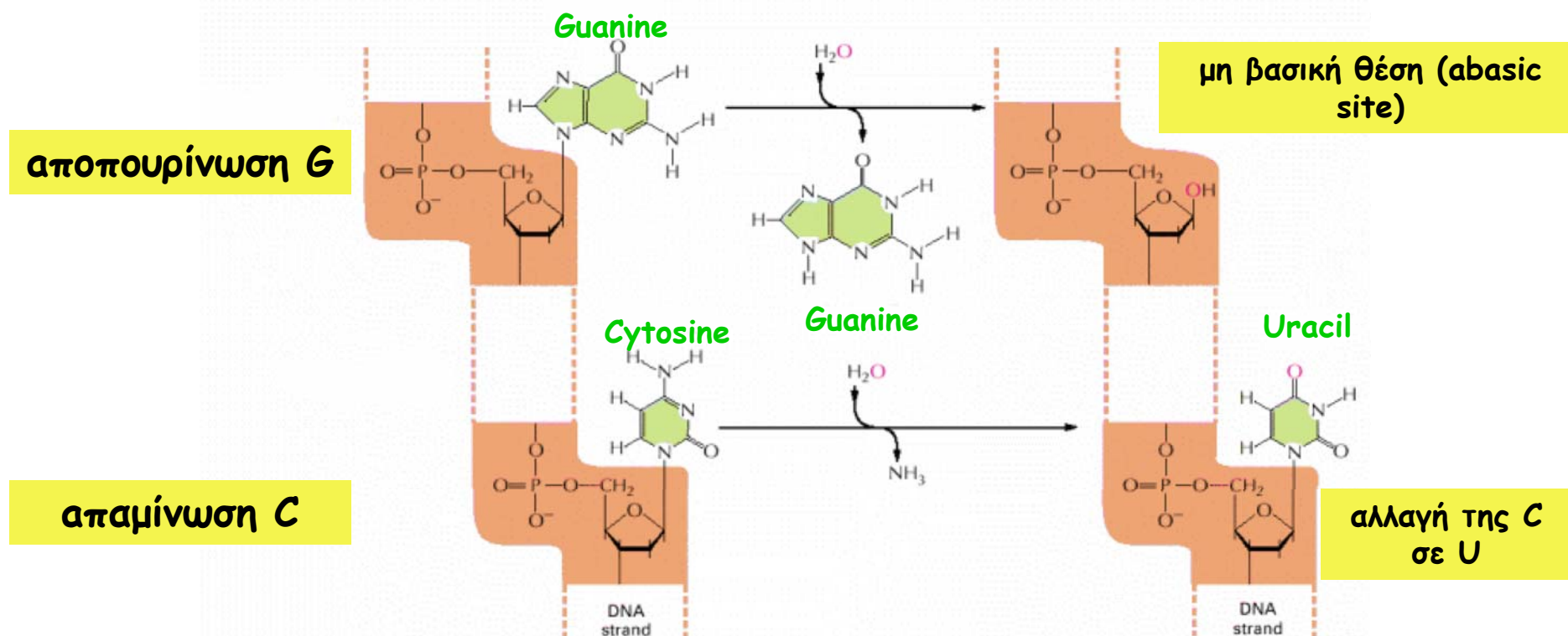
- **Οξειδώσεις**
- **Μεθυλιώσεις**
- **Υδρολύσεις (Αποπουρινώσεις ή απαμινώσεις)**



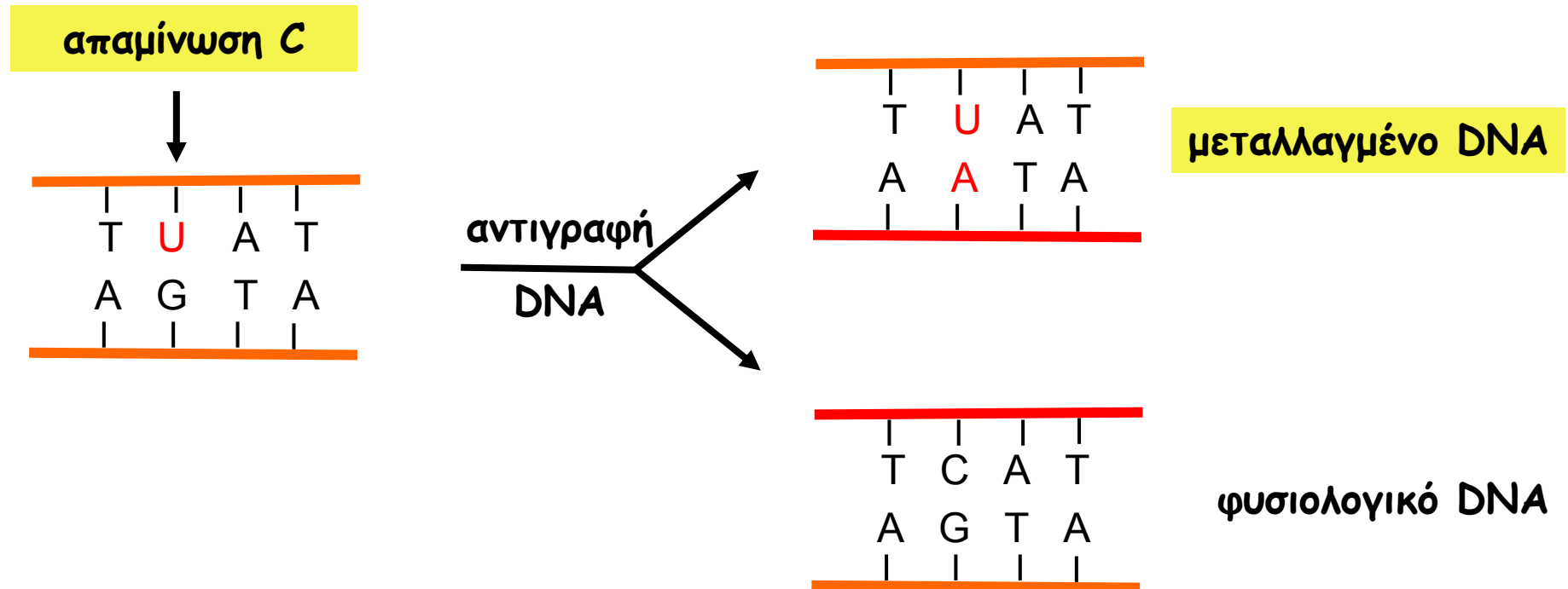
Αλλοιώσεις βάσεων: Μεθυλίωση



Αλλοιώσεις βάσεων: αποπουρίνωση και απαμίνωση



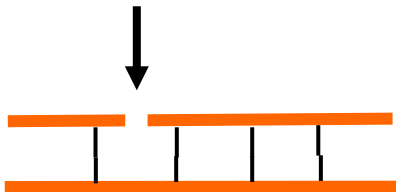
Απαμινώσεις νουκλεοτιδίων δύνανται να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις



Θραύσεις του DNA

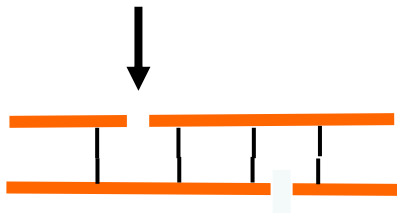


ss break



Θραύση της μίας αλυσίδας DNA
Οδηγεί σε μεταλλάξεις

ds break

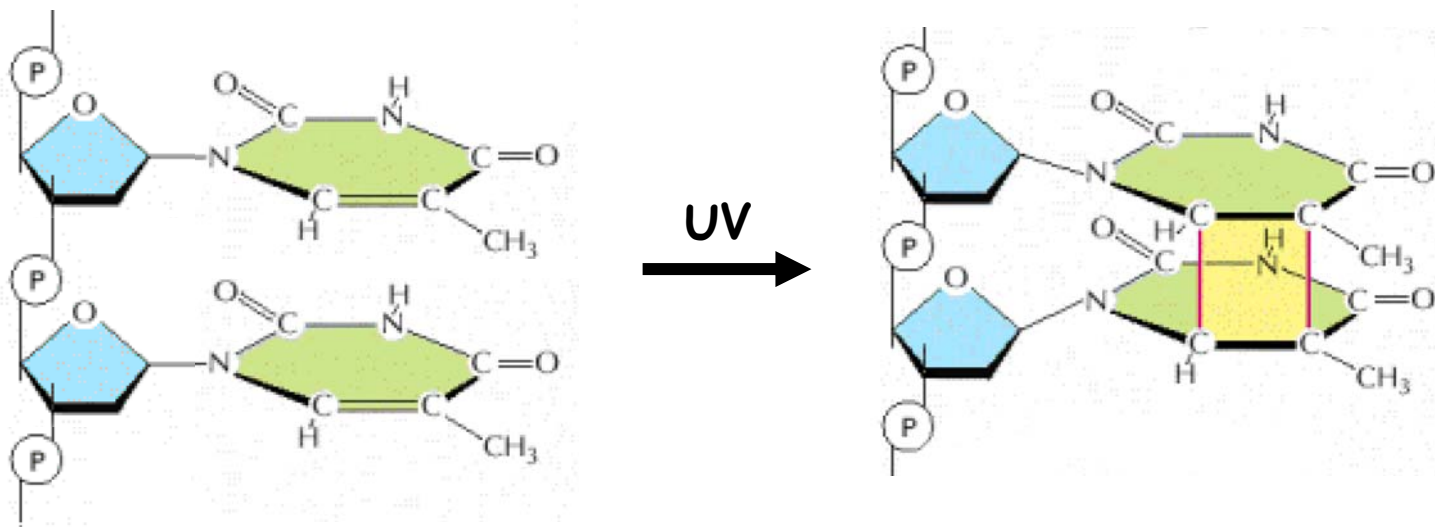


Θραύση των δύο αλυσίδων DNA
Οδηγεί σε καταστροφικές
χρωμοσωμικές αλλοιώσεις
(αστάθεια του γονιδιώματος)

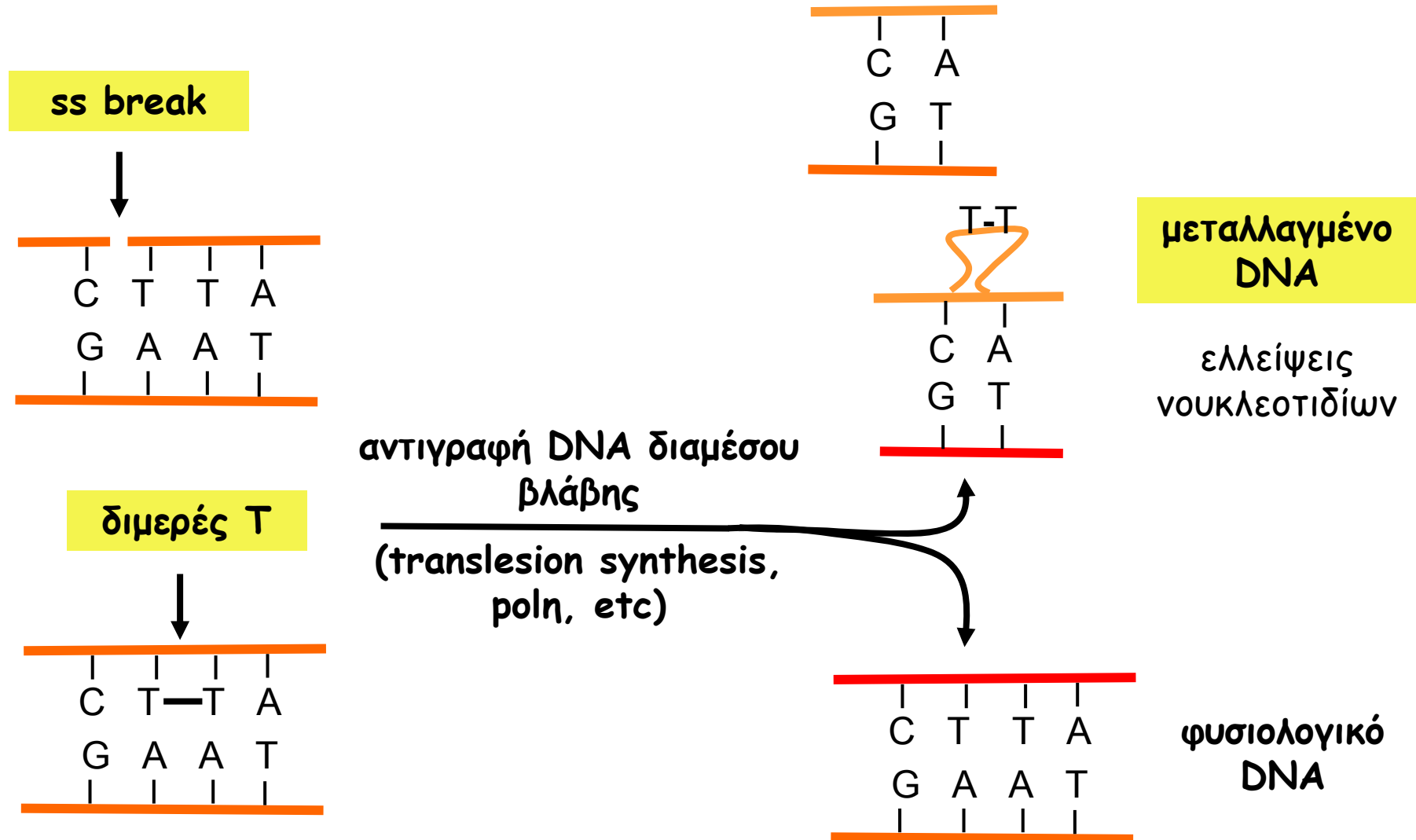
Διμερή Πυριμιδινών και ογκώδη πρόσθετα (bulk adducts)



- Υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Προκαλεί κυρίως συνένωση γειτονικών βάσεων T ή C και σχηματισμό διμερών πυριμιδινών $\overset{\wedge}{T T}$ $\overset{\wedge}{C C}$



Διμερή Πυριμιδινών, ογκώδη πρόσθετα και ss breaks δύνανται να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις





**Εάν δεν επιδιορθωθούν, βλάβες
στο DNA δύνανται να
οδηγήσουν σε εσφαλμένη
αντιγραφή του DNA και
δημιουργία μεταλλάξεων**

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA



- Αναγνωρίζουν τις βλάβες στο DNA και τις επιδιορθώνουν χρησιμοποιώντας ως «καλούπι» την πληροφορία από την συμπληρωματική αλυσίδα του DNA
- Προστατεύουν από μεταλλάξεις και αστάθεια του γονιδιώματος

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA



- Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA (π.χ. «τυπογραφικά» λάθη, αλλοιώσεις βάσεων, ss breaks)
- Μηχανισμοί επιδιόρθωσης θραύσεων των δύο αλυσίδων του DNA (double strand breaks)

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA



- **Mismatch repair (MMR)**

Διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA τα οποία οδηγούν στην εισαγωγή μίας ή λίγων (2-4) λανθασμένων (αλλά όχι αλλοιωμένων) βάσεων

- **Base excision repair (BER)**

Διορθώνει αλλοιώσεις μίας μόνο βάσης νουκλεοτιδίου (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ή απαμίνωση) και single strand breaks

- **Nucleotide excision repair (NER)**

Διορθώνει αλλοιώσεις που εκτείνονται σε δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια (για παράδειγμα διμερή θυμίνης) και την προσθήκη ογκωδών μορίων

Mismatch Repair (MMR)

Διορθώνει τα «τυπογραφικά λάθη» που εμφανίζονται κατά την αντιγραφή του DNA (προσθήκη 1-4 βάσεων/ απάλειψη 1-4 βάσεων/ εισδοχή μη συμπληρωματικής βάσης)

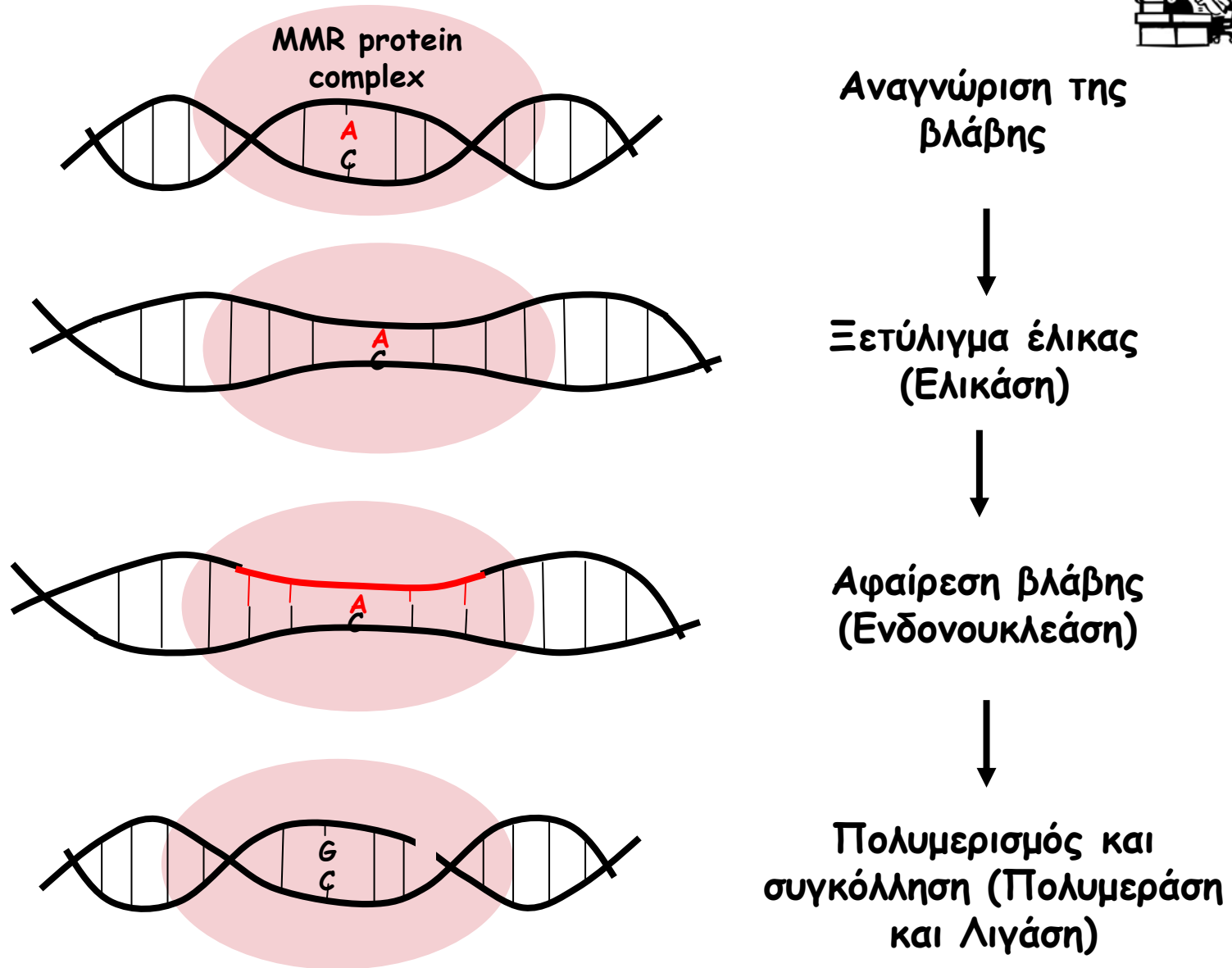


Mismatch Repair (MMR)

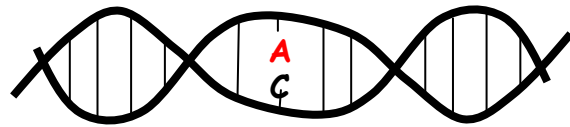


- Στοιχεία του MMR είναι συντηρημένα από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο
- Απενεργοποίηση του μηχανισμού MMR οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων
- Σφάλματα στο MMR pathway προδιαθέτουν σε καρκινογένεση στον άνθρωπο

Αρχή λειτουργίας του MMR

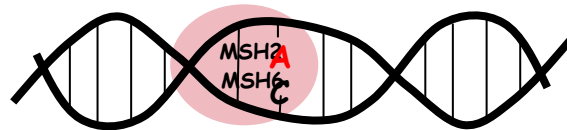


Μηχανισμός του MMR

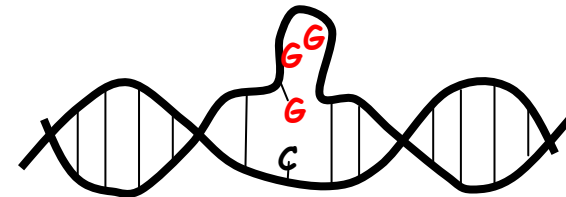
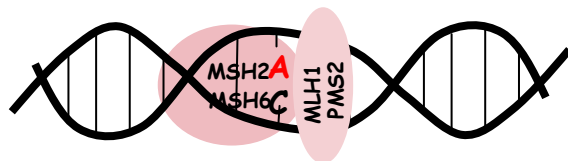


base-pair mismatch

↓
MSH2
MSH6

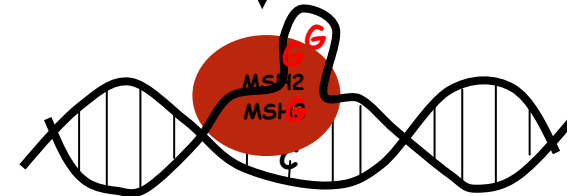


↓
MLH1
PMS2

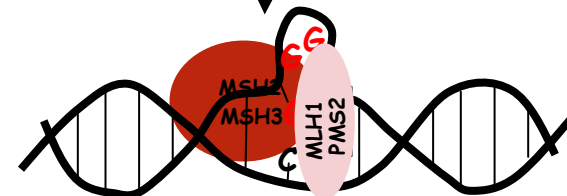


small insertions or deletions

↓
MSH2
MSH3



↓
MLH1
PMS2



Αναγνώριση
της βλάβης

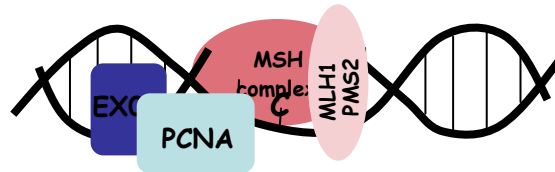
Μηχανισμός του MMR



Αναγνώριση της βλάβης

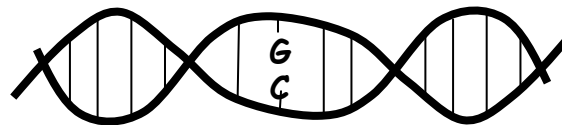
PCNA
helicase?
EXO1

Αφαίρεση βλάβης



DNA polδ, ε
ligase I

Πολυμερισμός και
συγκόλληση



MMR και καρκινογένεση: το σύνδρομο HNPCC



- HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colon Cancer

Κληρονομικό σύνδρομο στον άνθρωπο, το οποίο προδιαθέτει στην εμφάνιση καρκίνου του παχέως εντέρου

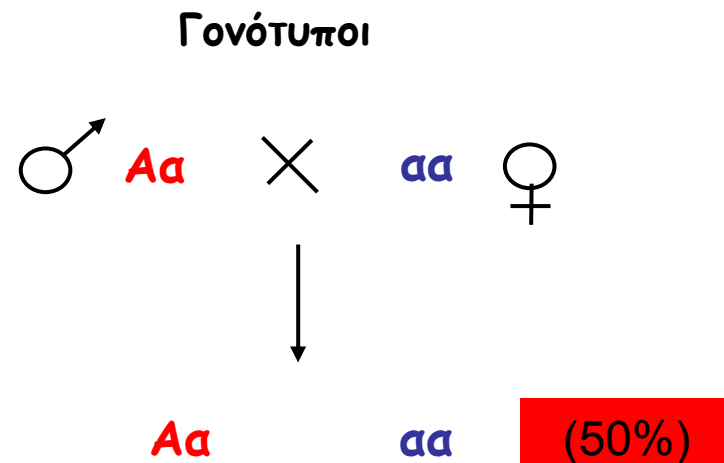
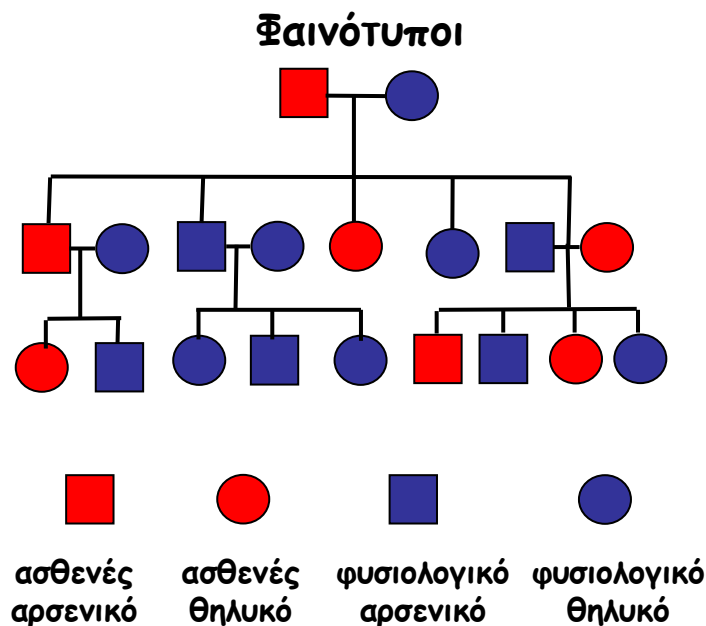
- Ευθύνεται για περίπου 5% των καρκίνων του παχέως εντέρου. Ο μέσος όρος διάγνωσης της νόσου σε ασθενείς με HNPCC είναι τα 44 έτη, ενώ σε ανθρώπους χωρίς το σύνδρομο είναι τα 64 έτη

- Οι ασθενείς με HNPCC παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα μεταλλαξογένεσης η οποία προδιαθέτει σε καρκινογένεση

Κληρονομικότητα του συνδρόμου HNPCC



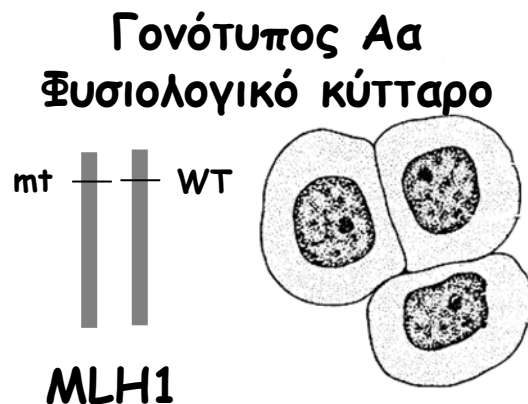
- Κληρονομείται ως αυτοσωμικό επικρατές και η πλειονότητα των ασθενών είναι ετερόζυγοι
- Κριτήρια επικινδυνότητας: τρεις ή περισσότεροι συγγενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου, ασθενείς σε συνεχόμενες γενιές και ένας τουλάχιστον διαγνώσθηκε πριν την ηλικία των 50 ετών



Μοριακή βάση του συνδρόμου HNPCC



- Οφείλεται σε κληρονομική μετάλλαξη ενός από τα MMR γονίδια, συνήθως των MLH1 (50% των περιπτώσεων) ή MSH2 (40%)
- Ασθενείς με HNPCC είναι ετερόζυγοι για ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο MMR γονίδιο (Aa). Τα φυσιολογικά τους κύτταρα διαθέτουν επαρκή ενεργότητα mismatch repair
- Καταστολή της έκφρασης του φυσιολογικού αλληλομόρφου γονιδίου MMR λόγω μετάλλαξης, απάλειψης του γονιδίου ή υπερμεθυλίωσης του υποκινήτη οδηγεί σε συσσώρευση μεταλλάξεων
- Η συσσώρευση μεταλλάξεων προδιαθέτει σε καρκινογένεση (Πώς?)



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA



- Mismatch repair (MMR)
- Base excision repair (BER)
- Nucleotide excision repair (NER)

Base Excision Repair (BER)

- Διορθώνει αλλοιώσεις (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, απαμίνωση) βάσης νουκλεοτιδίου
- Διορθώνει θραύσεις της μίας αλυσίδας του DNA (single strand breaks)
- Στοιχεία του BER είναι συντηρημένα από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο



αλλοιώσεις βάσεων



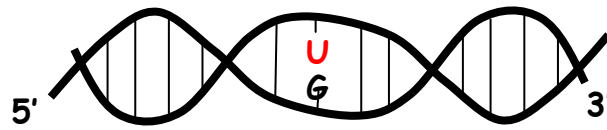
ss breaks

Αλλοιώσεις βάσης νουκλεοτιδίου

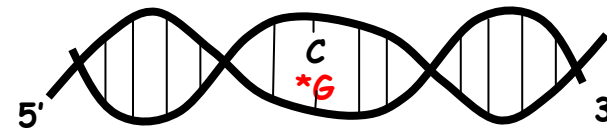


- Είναι το συνηθέστερο είδος βλαβών του DNA (για παράδειγμα, αυθόρμητες απαμινώσεις συμβαίνουν σε 10,000 βάσεις/ κύτταρο/ ημέρα)
- Προϊόντα του μεταβολισμού καθώς και όλες σχεδόν οι διαβρωτικές και τοξικές ουσίες του περιβάλλοντος δημιουργούν αλλοιώσεις βάσεων νουκλεοτιδίων ή/ και ss breaks
- Παρόλο που οι μηχανισμοί BER είναι υπεύθυνοι για επιδιόρθωση μεγάλου ποσοστού βλαβών του DNA, σφάλματα στο BER pathway δεν έχουν συσχετισθεί με καρκινική προδιάθεση στον άνθρωπο

BER - Επισκευή αλλοιωμένης βάσης νουκλεοτιδίου

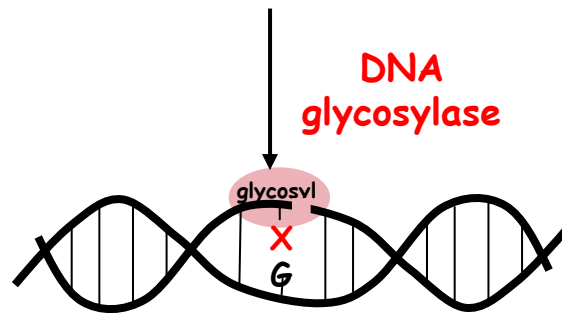


Απαμίνωση (αλλαγή C σε U)



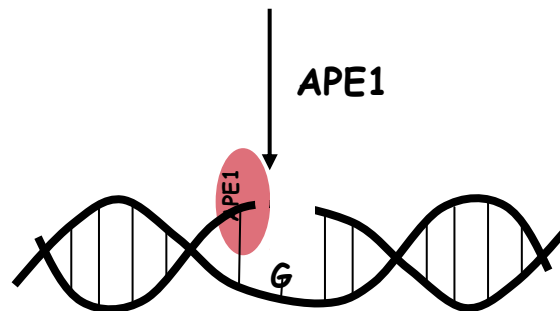
Οξειδωμένη ή μεθυλιωμένη βάση

Αναγνώριση
της βλάβης



Δημιουργία μη βασικής
θέσης και κόψιμο του
φωσφοδιεστερικού δεσμού
του DNA 3' από τη βλάβη

Επεξεργασία
της βλάβης



Αναγνώριση της μη
βασικής θέσης και κόψιμο
του φωσφοδιεστερικού
δεσμού 5' από τη βλάβη

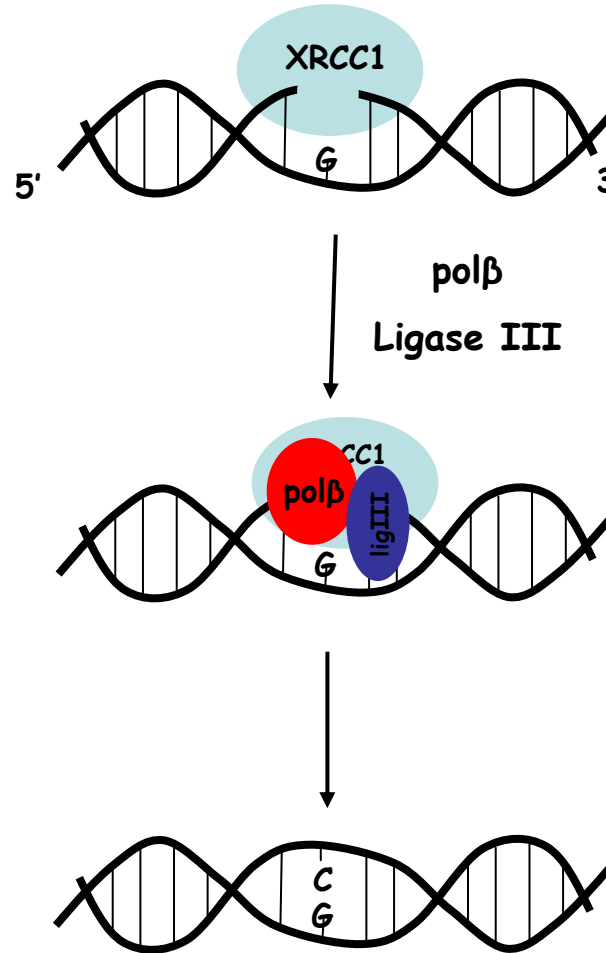
Προσέλκυση της XRCC1

BER - Επισκευή αλλοιωμένης βάσης νουκλεοτιδίου

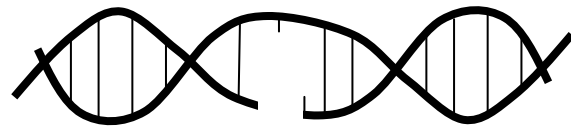


Προσθήκη του
συμπληρωματικού
νουκλεοτιδίου και συγκόλληση

Επιδιορθωμένη βλάβη



Επισκευή ss breaks: οι πρωτεΐνες PARP και PNK



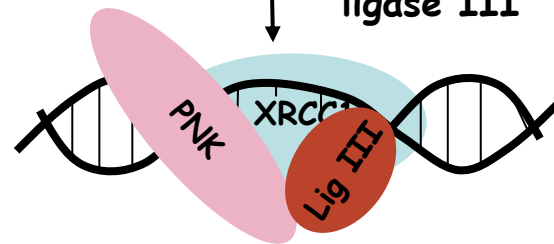
ss break

PARP



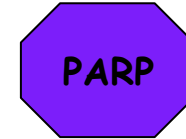
Αναγνώριση
βλάβης

PNK, XRCC1,
ligase III

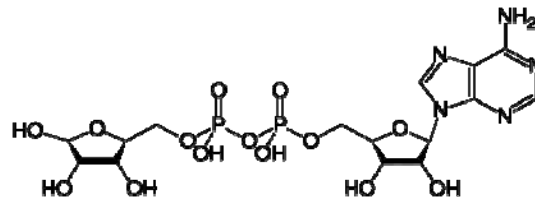


Επεξεργασία
βλάβης

Επισκευή ss breaks: η πρωτεΐνη PARP

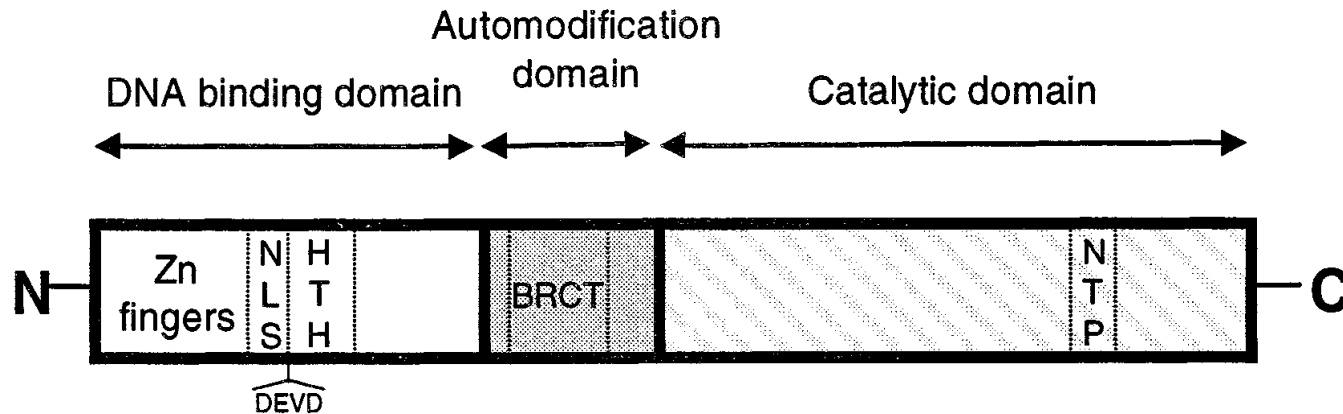
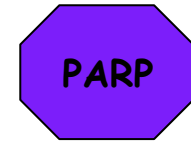


- PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase. Πυρηνική πρωτεΐνη, απαντάται στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- Προσδένεται σε σπασίματα του DNA και συνθέτει αλυσίδες όλιγο- ή πόλυ-(ADP-ριβόζης) χρησιμοποιώντας NAD⁺
- Τις αλυσίδες αυτές τις προσθέτει ομοιοπολικά στον εαυτό της ή άλλες πρωτεΐνες-στόχους
- Η ενεργότητα της ρυθμίζεται από τα επίπεδα αυτο-τροποποίησής της (αλυσίδες ADP-ριβόζης). Για πλήρη ενεργότητα, απαιτείται πρόσδεση της PARP σε σπασίματα του DNA
- Προσθήκη αλυσίδων ADP-ριβόζης σε πρωτεΐνες-στόχους είναι απαραίτητη για το σωστό εντοπισμό και λειτουργία αυτών



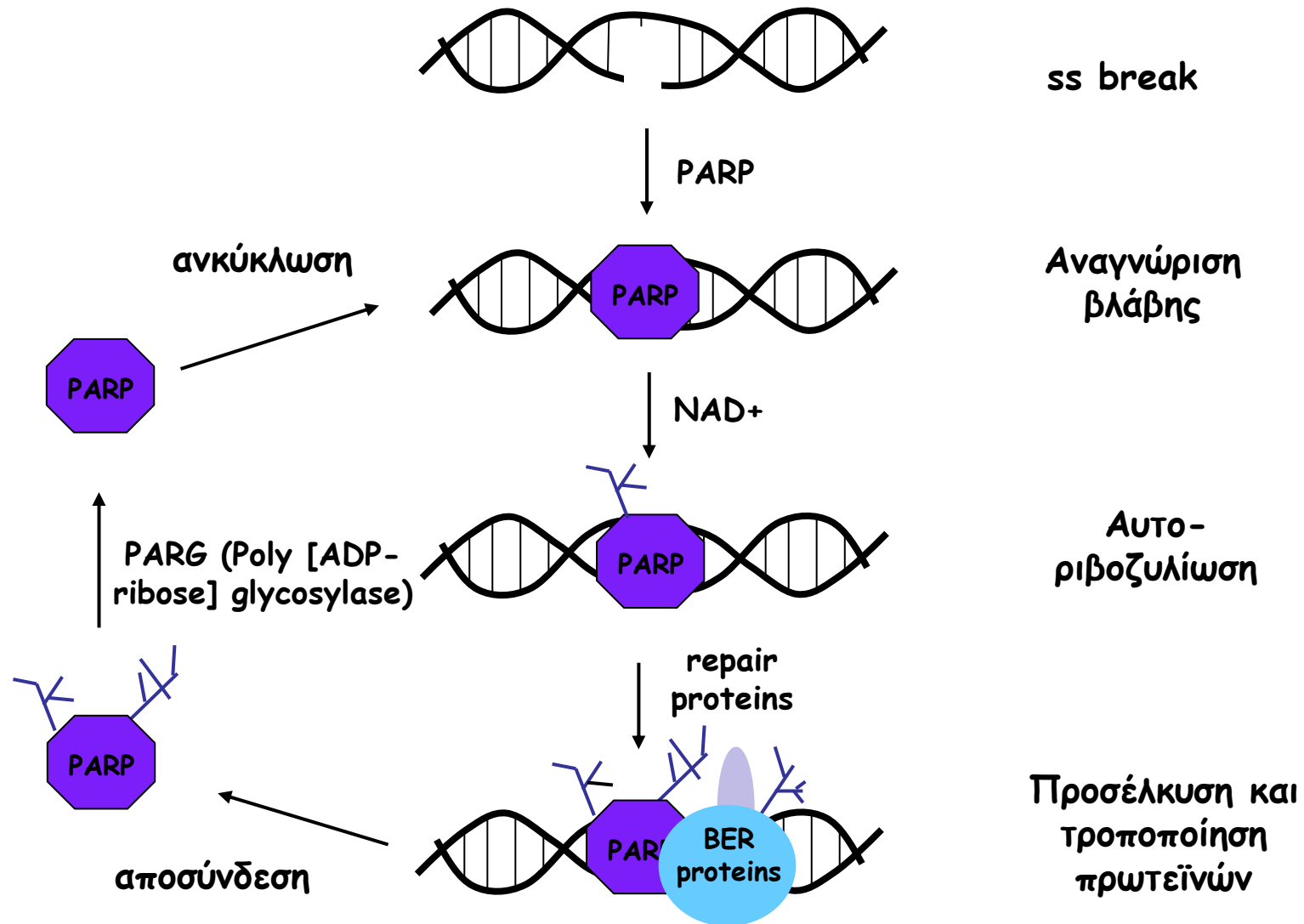
ADP-ριβόζη

PARP: Δομή και λειτουργίες



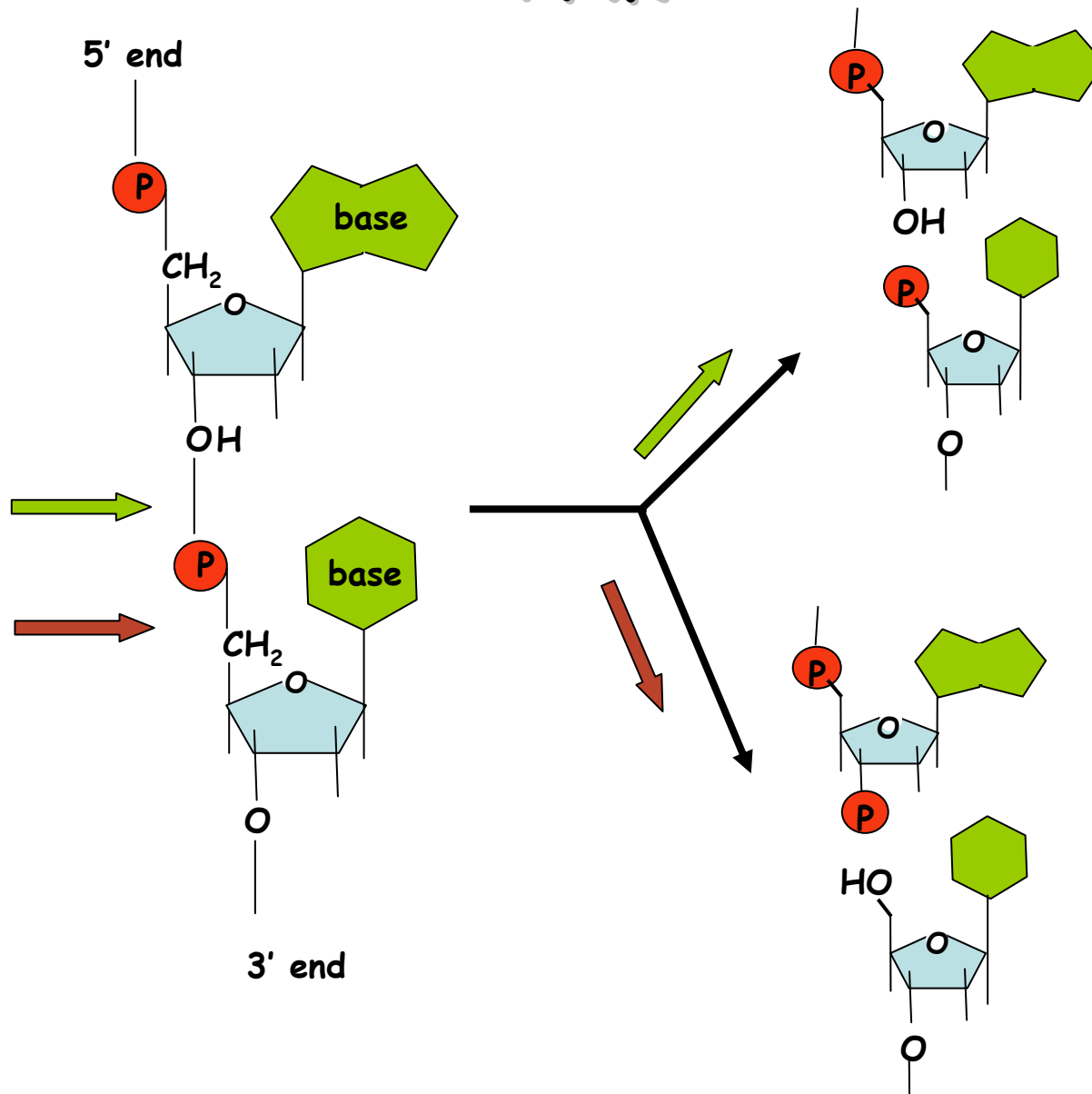
- Ενεργοποιείται μετά από σπασίματα του DNA και συμμετέχει στην επιδιόρθωση των ss breaks
- Ακόμη, παίζει ρόλους κατά την απόπτωση, την επιδιόρθωση των ds breaks και την αντιγραφή του DNA

Επισκευή ss breaks: μηχανισμός δράσης της PARP



Επισκευή ss breaks: η πρωτεΐνη PNK

PNK



Λιγάση μπορεί να
συγκολλήσει το
φωσφοδιεστερικό
δεσμό (30%)

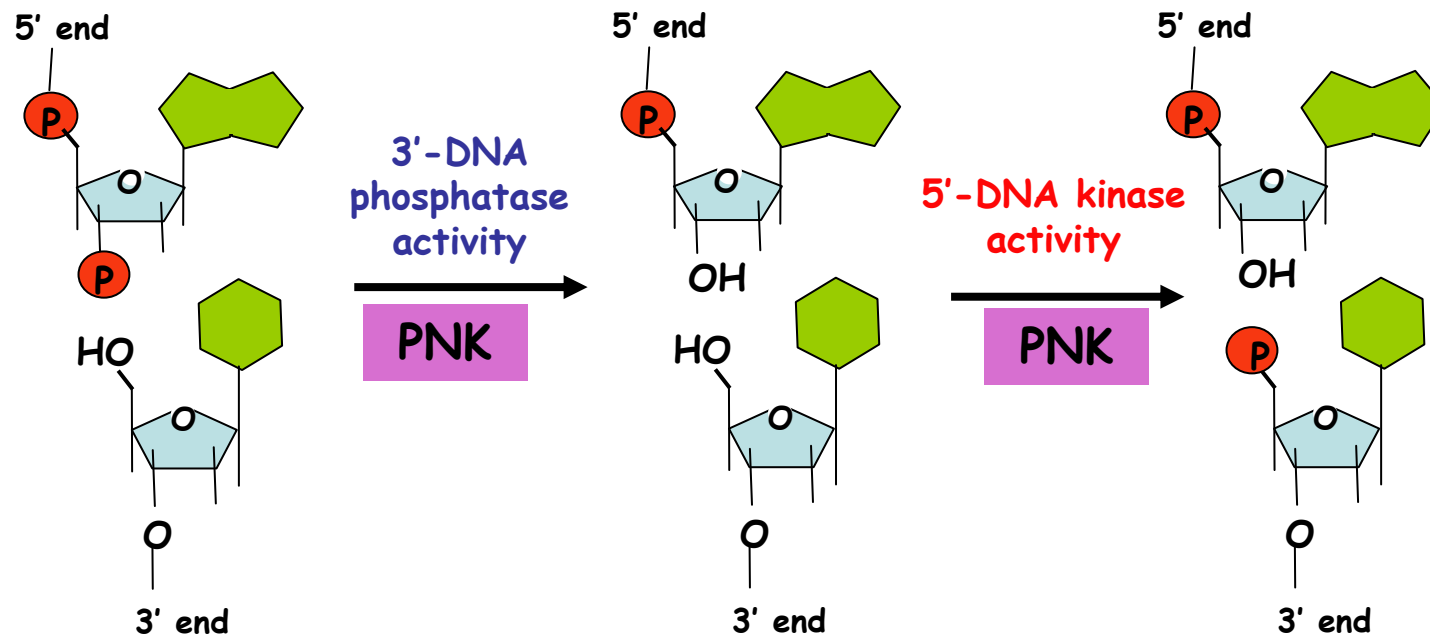
Λιγάση **δεν** μπορεί
να συγκολλήσει το
φωσφοδιεστερικό
δεσμό (70%)

**Χρειάζεται η
PNK**

Ο ρόλος της PNK

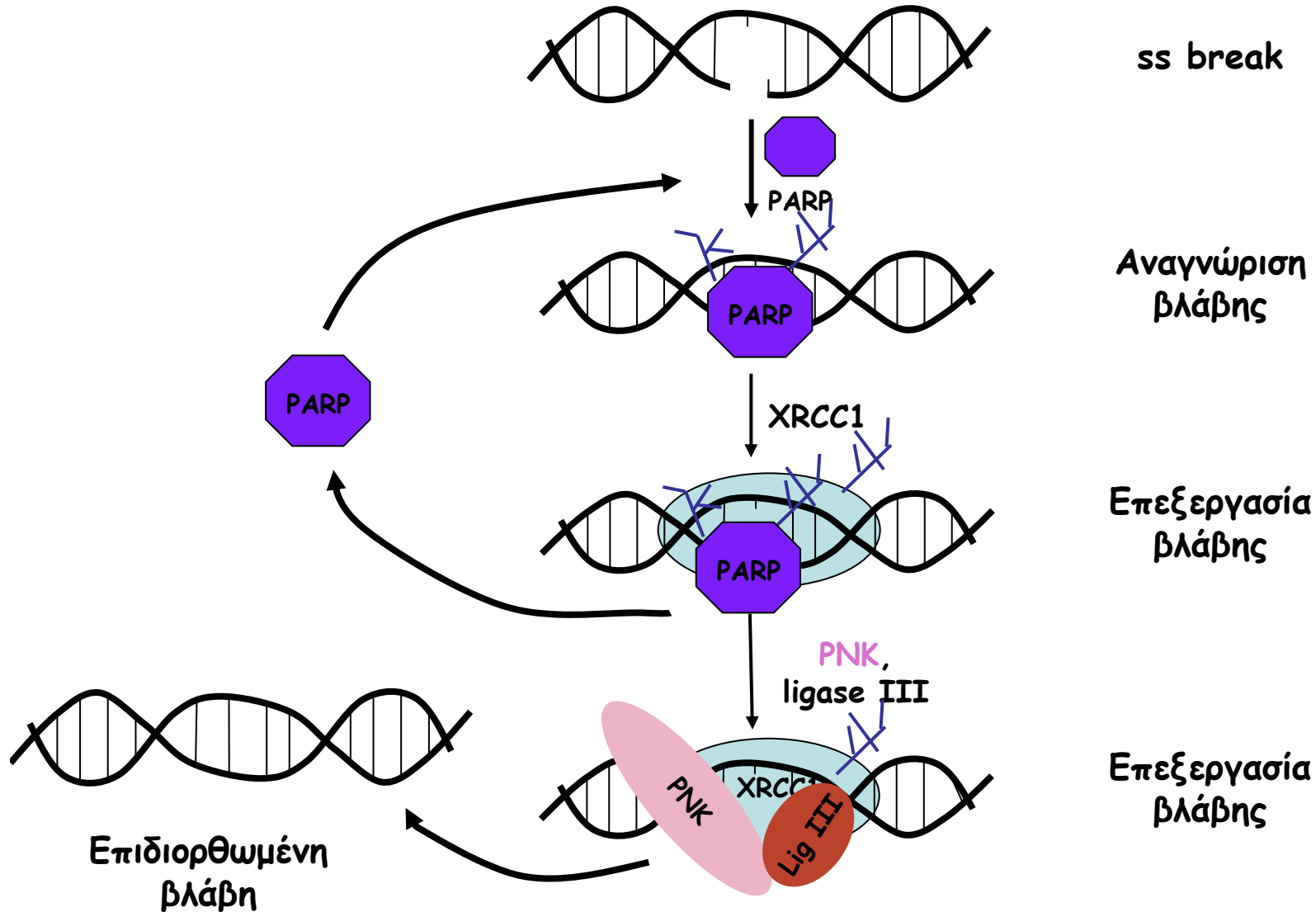


Είναι ένζυμο που διαθέτει **3'-DNA phosphatase** και **5'-DNA kinase** ενεργότητα



Λιγάση μπορεί να συγκολλήσει το φωσφοδιεστερικό δεσμό

BER- Επισκευή ss breaks



BER και καρκινογένεση



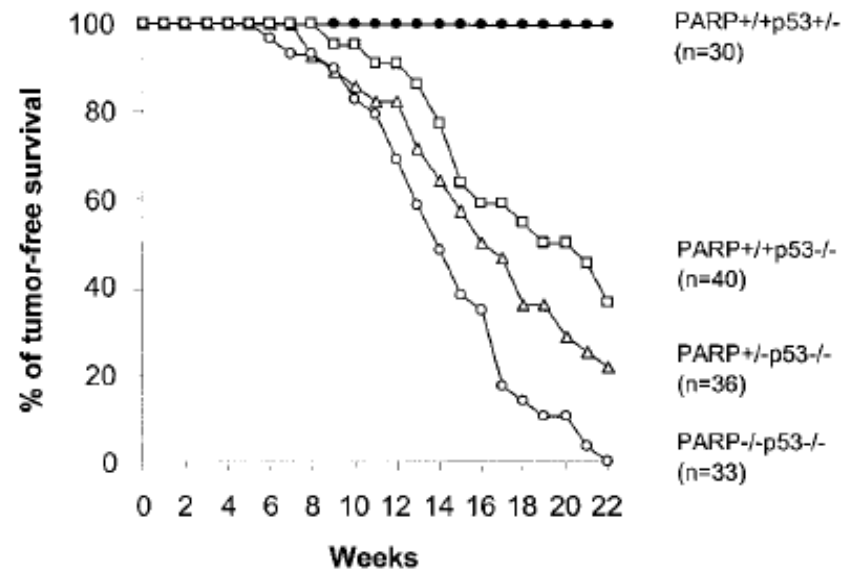
- Απενεργοποίηση του BER σε *E. Coli*, μύκητες και κύτταρα θηλαστικών συνδέεται με αυξημένη συχνότητα αυθόρμητων σημειακών μεταλλάξεων
- Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμα άμεση σύνδεση μεταξύ απωλειών στο BER και προδιάθεσης για καρκινογένεση στον άνθρωπο
- Απενεργοποίηση (απάλειψη) γονιδίων-κλειδιά για το BER (APE1, XRCC1, Ligase III, DNA polβ) επιφέρουν θανάτωση κατά την εμβρυογένεση στον ποντικό
- Απενεργοποίηση γονιδίων BER τα οποία δεν προκαλούν θανάτωση κατά την εμβρυογένεση (PARP) δεν οδηγούν σε αυξημένη αυθόρμητη καρκινογένεση στον ποντικό, πιθανά λόγω συμπληρωματικότητας (redundancy) με άλλους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου

PARP και καρκινογένεση



- PARP (PARP-1) KO ποντίκια είναι βιώσιμα, γόνιμα και απώλεια της PARP δεν είναι αρκετή για να οδηγήσει σε αυθόρμητη καρκινογένεση
- Επειδή το γενετικό υπόβαθρο παίζει μεγάλη σημασία στην καρκινογένεση, ίσως απαιτούνται επιπλέον γενετικές αλλαγές για επαγωγή καρκινογένεσης απουσία της PARP
- Πραγματικά, απενεργοποίηση της PARP ενισχύει την καρκινογένεση σε P53 KO ποντικούς

Η PARP συνεργάζεται με την P53 για προστασία έναντι της καρκινογένεσης



Απενεργοποίηση της PARP επιταχύνει την καρκινογένεση
σε P53 -/- ποντίκια

Συμπεράσματα από τη μελέτη του ρόλου γονιδίων BER στην καρκινογένεση (I)



Ο προστατευτικός ρόλος κάποιων γονιδίων έναντι της καρκινογένεσης μπορεί να μην είναι άμεσα ορατός:

- Εάν απώλεια αυτών προκαλεί θάνατο κατά την εμβρυογένεση, φάση κατά την οποία τα εμβρυϊκά κύτταρα διαιρούνται συνεχώς και είναι περισσότερο ευαίσθητα σε βλάβες του DNA (APE1, XRCC1, Ligase III, DNA polβ)
- Εάν υπάρχει συμπληρωματικότητα (redundancy) με λειτουργίες άλλων γονιδίων (PARP?)

Συμπεράσματα από τη μελέτη του ρόλου γονιδίων BER στην καρκινογένεση (II)



Το γενετικό υπόβαθρο είναι πολύ σημαντικό για την καρκινογένεση:

Απενεργοποίηση γονιδίων τα οποία είναι σημαντικά για προστασία έναντι μεταλλάξεων (PARP) πρέπει να συνδυαστεί με απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων ώστε να επαχθεί καρκινογένεση

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA



- Mismatch repair (MMR)
- Base excision repair (BER)
- **Nucleotide excision repair (NER)**

Nucleotide Excision Repair (NER)

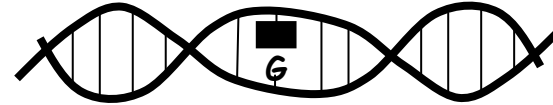
- Διορθώνει βλάβες οι οποίες παραμορφώνουν το σχήμα της έλικας του DNA, όπως σχηματισμός διμερών πυριμιδινών και ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων
- Τέτοιες βλάβες προκαλούνται από χημικά καρκινογόνα και την υπεριώδη ακτινοβολία



Μηχανισμός του NER



διμερή πυριμιδινών



ογκώδες μόριο

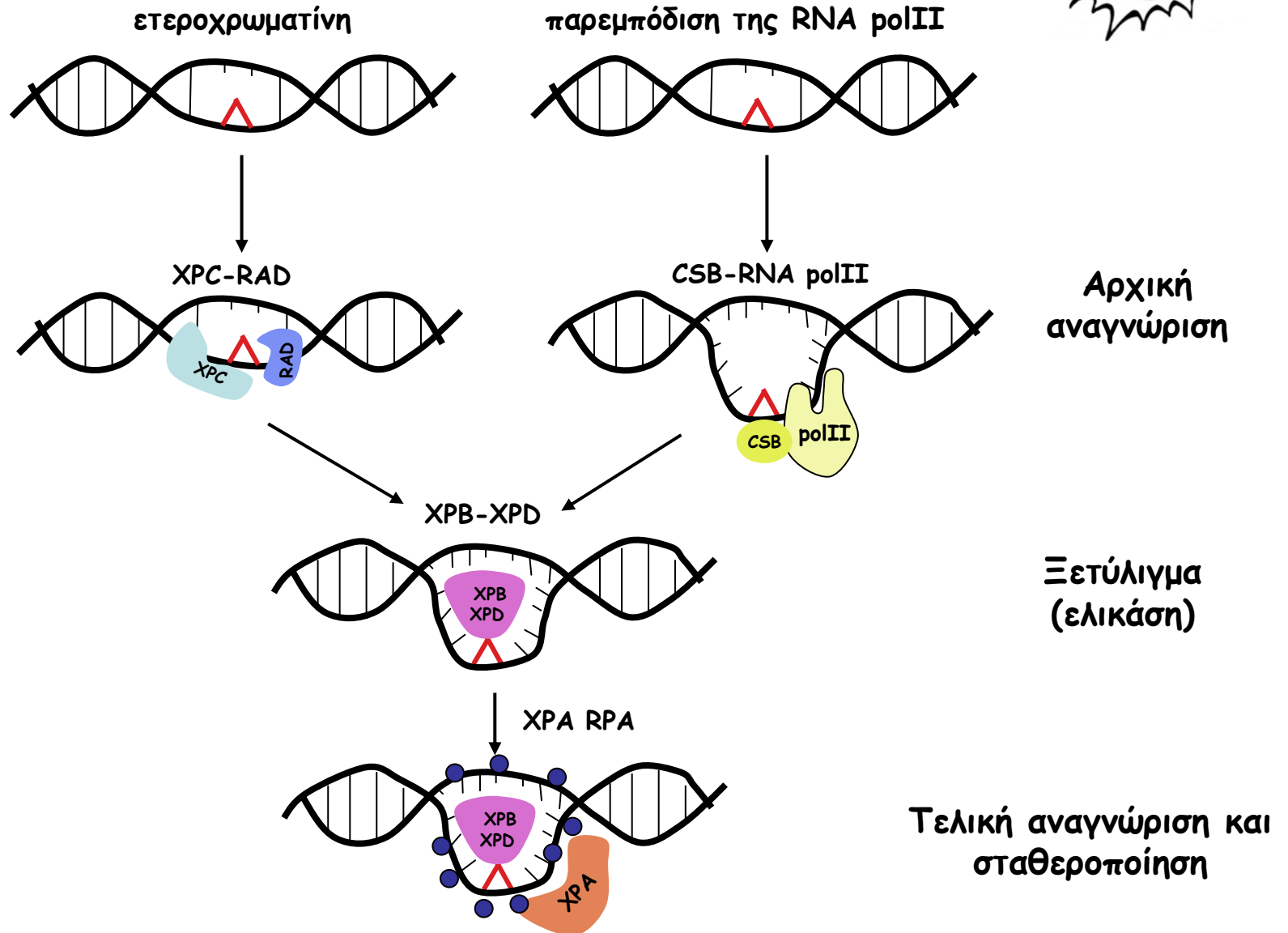
Στο μηχανισμό NER συμμετέχουν περίπου 30 πρωτεΐνες σε κύτταρα θηλαστικών

Διακρίνεται σε δύο υπομηχανισμούς:

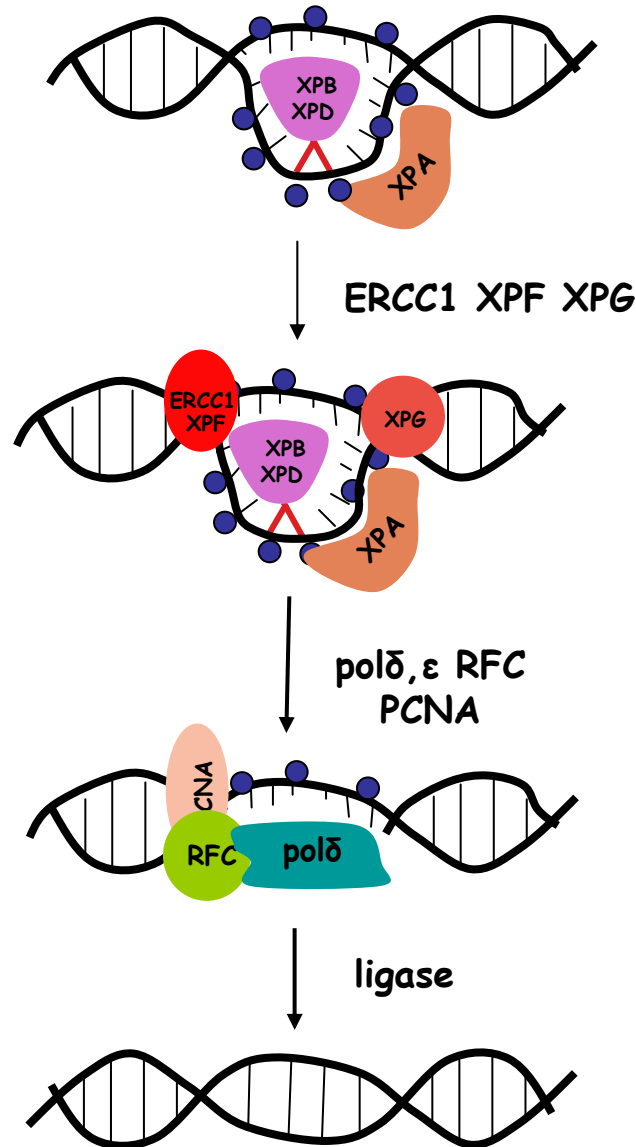
- **Transcription Coupled Repair (TCR)**: διορθώνει βλάβες που εμποδίζουν την RNA polII και επιδιορθώνει γονίδια που εκφράζονται
- **Global Genomic Repair (GGR)**: διορθώνει βλάβες σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες δεν εκφράζονται (ετεροχρωματίνη)

Και οι δύο υπομηχανισμοί έχουν αντίστοιχα στάδια και διαφέρουν μόνο στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο αρχικό στάδιο αναγνώρισης της βλάβης

NER- επιδιόρθωση διμερών πυριμιδινών



Ο μηχανισμός του NER



Τελική αναγνώριση και σταθεροποίηση

Αφαίρεση βλάβης (Ενδονουκλεάση)

Πολυμερισμός

Επιδιορθωμένη βλάβη

NER και καρκινογένεση: το σύνδρομο Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας (Xeroderma Pigmentosum, XP)



- Σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από φωτοευαισθησία και οξεία προδιάθεση σε καρκίνο του δέρματος
- Συμπτώματα: Δέρμα λεπτό, ξηρό, ξεφλουδίζει εύκολα, με πολλές φακίδες και υπερευαισθησία σε εγκαύματα
- Κληρονομείται ως αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο
- Μοριακή βάση: 7 υποομάδες κάθε μία με μεταλλάξεις σε ένα ή δύο γονίδια που συμμετέχουν στο NER. Η κλασική μορφή του συνδρόμου χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη στο γονίδιο XPA (κωδικοποιεί μια ενδονουκλεάση η οποία αφαιρεί τη βλάβη)

NER και καρκινογένεση: το σύνδρομο Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας



- Μεταλλάξεις σε γονίδια του NER οι οποίες σχετίζονται με το σύνδρομο XP, οδηγούν σε μείωση της ενεργότητας ή απενεργοποίηση του μηχανισμού NER
- Αποτέλεσμα: Δεν επιδιορθώνονται επαρκώς οι βλάβες του DNA κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία με συνακόλουθη συσσώρευση μεταλλάξεων και προδιάθεση σε καρκινογένεση
- Καρκινικοί ιστοί ασθενών με XP έχουν μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε απενεργοποίηση της πρωτεΐνης P53 και σχεδόν όλες είναι UV-σχετικές (C->T ή CC->TT σε θέσεις με δύο γειτονικές πυριμιδίνες)

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA



- **Μηχανισμός Mismatch Repair** (πρωτεΐνες MLH, MSH, PMS)

Διόρθωση «τυπογραφικών» λαθών της DNA pol

- **Μηχανισμοί Base Excision Repair**

> Μηχανισμός πρωτεϊνών DNA glycosylase, APE1

Επιδιόρθωση αλλοιωμένης βάσης νουκλεοτιδίου

> Μηχανισμός πρωτεϊνών PARP, PNK

Επιδιόρθωση ss breaks

- **Μηχανισμοί Nucleotide Excision Repair** (πρωτεΐνες XP)

Επιδιόρθωση ογκωδών προσθέτων και διμερών πυριμιδινών

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA: κοινά χαρακτηριστικά



- Χρησιμοποιούν ποικιλία πρωτεϊνών για την επιδιόρθωση της βλάβης
- Εμφανίζουν εξειδίκευση κατά την αναγνώριση της βλάβης του DNA μέσω πρωτεϊνών οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλλοιώσεις βάσεων ή διαταραχές στη γεωμετρία του DNA
- Έχουν ομοιότητες ως προς τα βασικά στάδια που ακολουθούν: αναγνώριση βλάβης, αφαίρεση λανθασμένων νουκλεοτιδίων, συμπλήρωση του κενού από DNA pol, συγκόλληση της επιδιορθωμένης αλυσίδας DNA
- Απενεργοποίηση των παραπάνω μηχανισμών οδηγεί σε αυξημένη μεταλλαξογένεση και προδιαθέτει σε καρκινογένεση και συνδέεται με την εμφάνιση συνδρόμων στον άνθρωπο τα οποία προδιαθέτουν σε καρκινογένεση