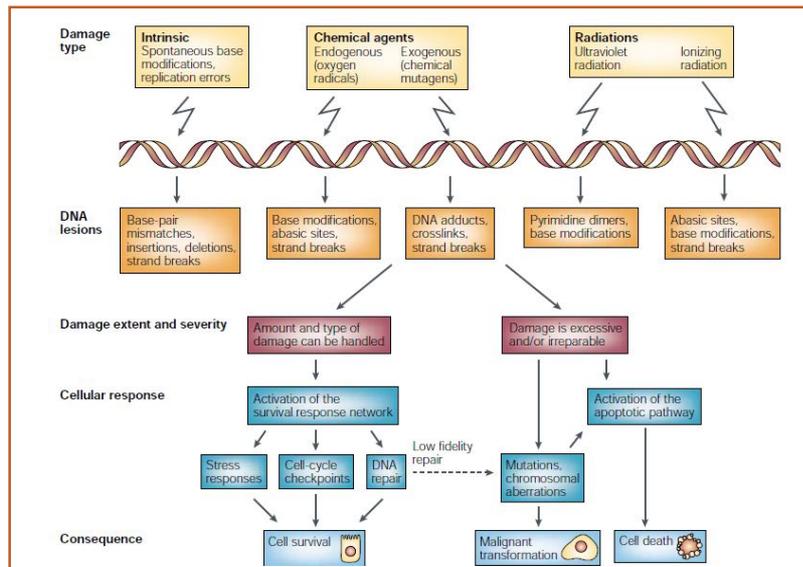


PROCESAMIENTO DE LAS LESIONES DEL ADN: REPARACION Y MUTAGENESIS. RESPUESTA ADAPTATIVA

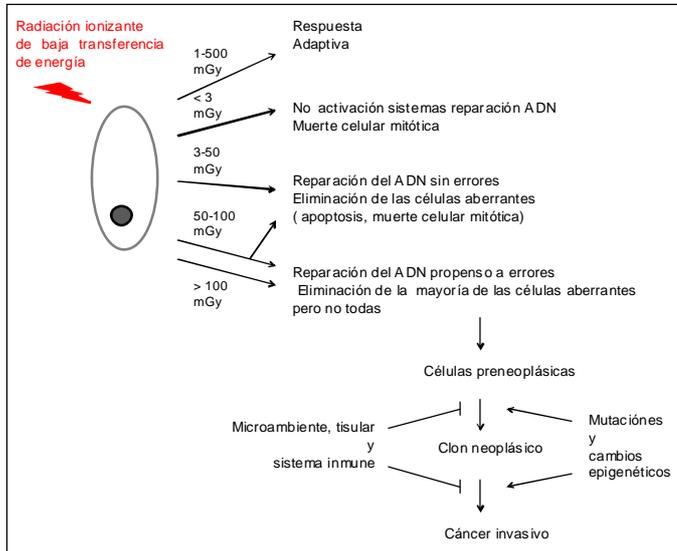
Javier Santos, Profesor Titular de Genética

Departamento de Biología Celular e Inmunología. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Universidad Autónoma de Madrid

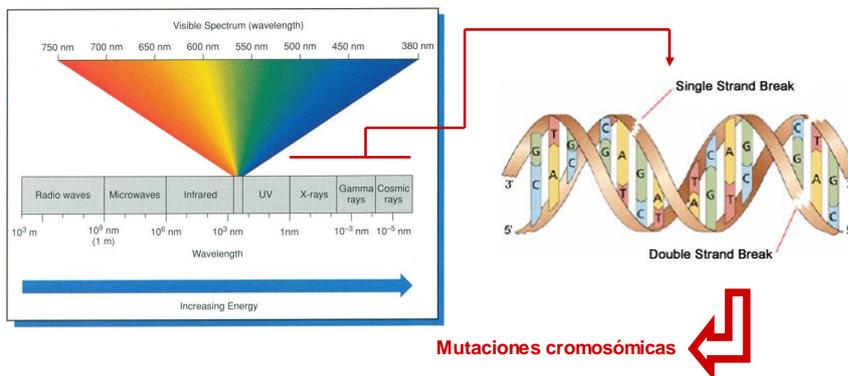
La radiación ionizante es un potente agente genotóxico y mutagénico



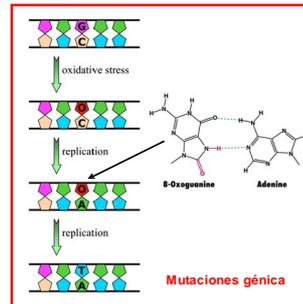
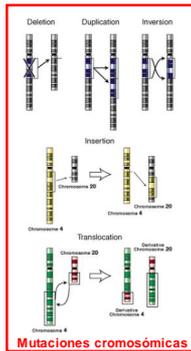
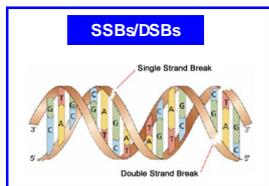
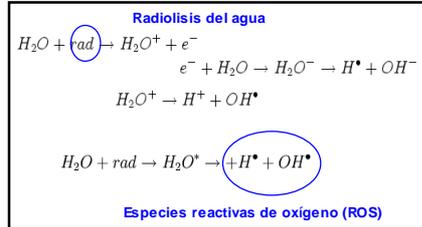
Los efectos de la radiación ionizante dependen del tipo y dosis recibida



Acción directa de las radiaciones ionizantes sobre el ADN: Roturas de cadena sencilla (SSBs) y doble cadena (DSBs)

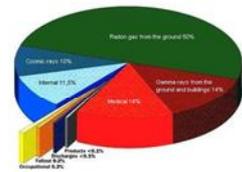


Acción indirecta de las radiaciones ionizantes sobre el ADN: Especies Reactivas de Oxígeno



Los sistemas biológicos de protección frente a la RI: un regalo evolutivo

El ser humano está continuamente expuesto a bajos niveles de RI



Fuentes naturales de radiaciones ionizantes que recibimos actualmente. Fuente "Living with Radiation", NRPB, 1998

¿Cómo se protege contra los efectos de las RI?

- Los primeros mamíferos tuvieron que vivir en un ambiente con unos niveles de RI natural mucho más elevados que los actuales
- Se adaptaron a este ambiente hostil desarrollando un **sistema de protección natural** → genes de respuesta a la RI

Genes de respuesta a la RI:

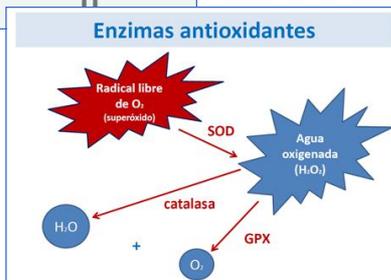
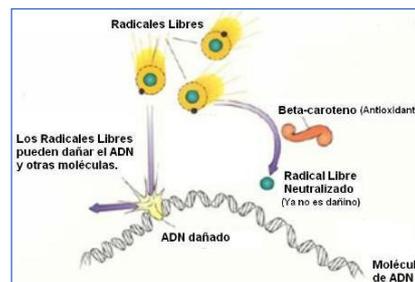
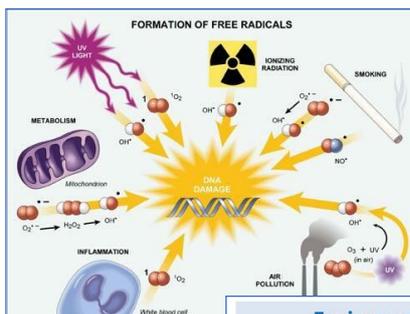
- Producción de antioxidantes
- Sistemas de reparación del ADN
- Apoptosis de células severamente dañadas
- Proceso apoptótico protector mediado epigenéticamente (o epiaoptosis) que elimina selectivamente las células precancerígenas
- Estimulación del sistema inmune frente al cáncer

Fenotipo de protección adaptativa activado por bajas dosis de RI (<0.1Gy): mimetizan situaciones con niveles de RI natural más elevados que los actuales

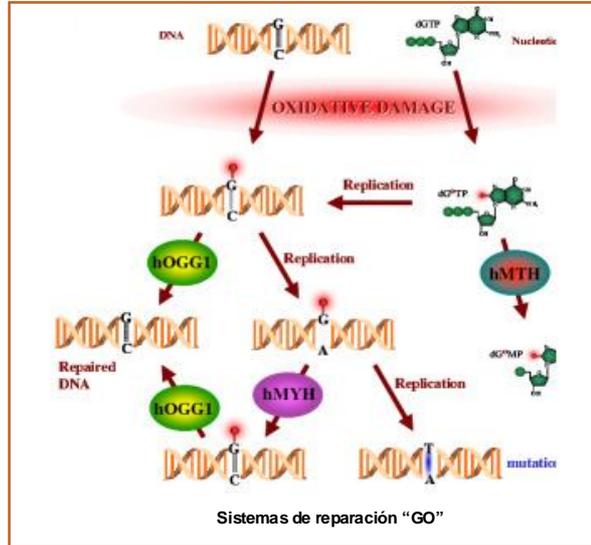
PARTE I MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO RADIOINDUCIDO



Sistemas preventivos frente al daño oxidativo

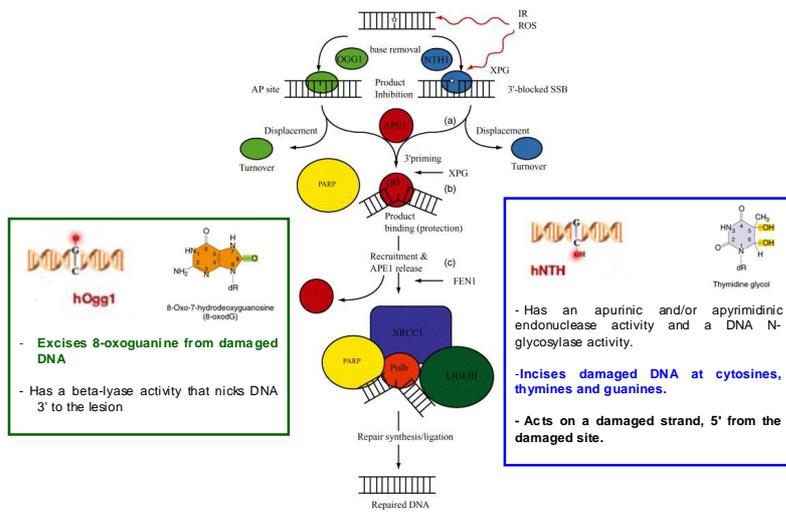


Reparación de bases con daño oxidativo y SSBs

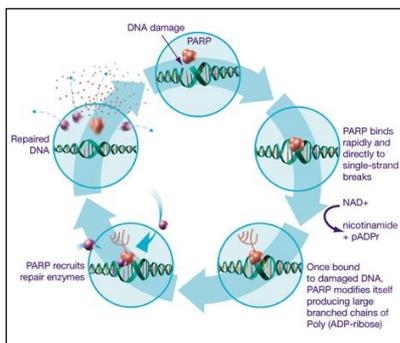


Reparación de bases con daño oxidativo y SSBs

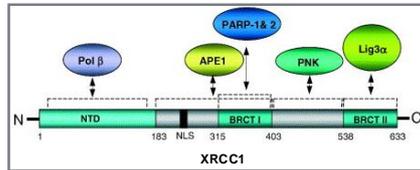
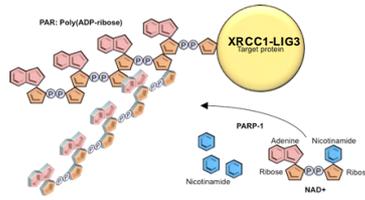
Sistema de reparación por escisión de bases (o BER, Base Excision Repair)



Reparación de bases con daño oxidativo y SSBs

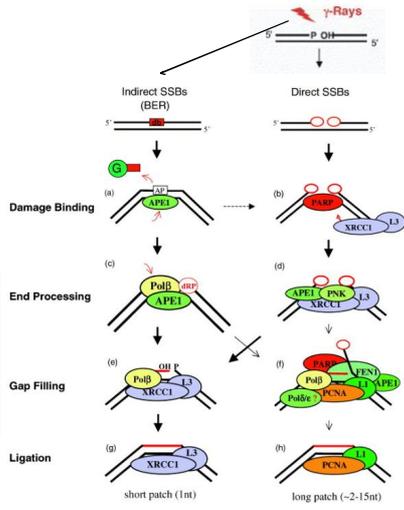
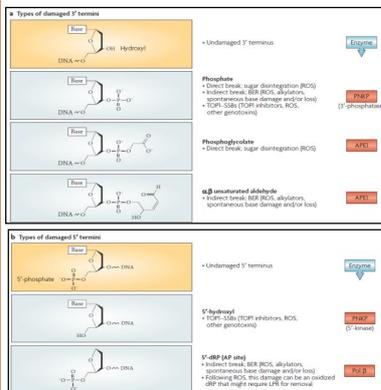


PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1) recluta al complejo XRCC1-LIG3

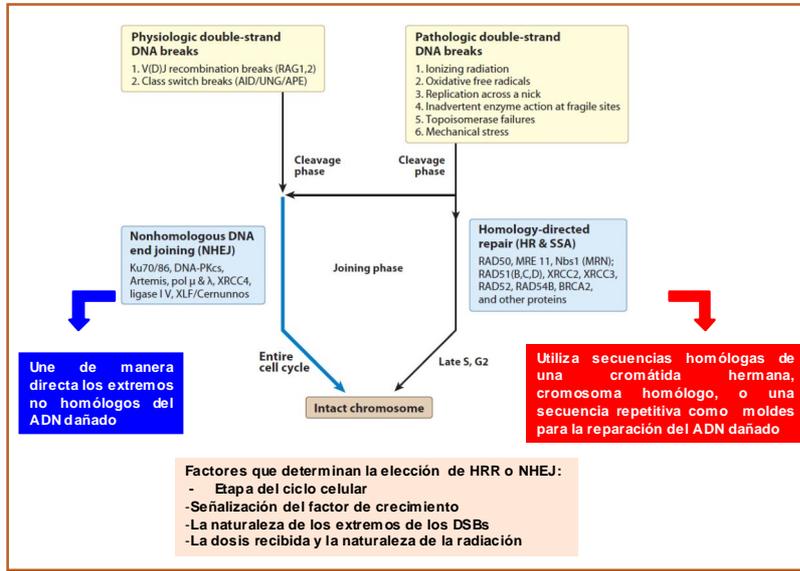


Reparación de bases con daño oxidativo y SSBs

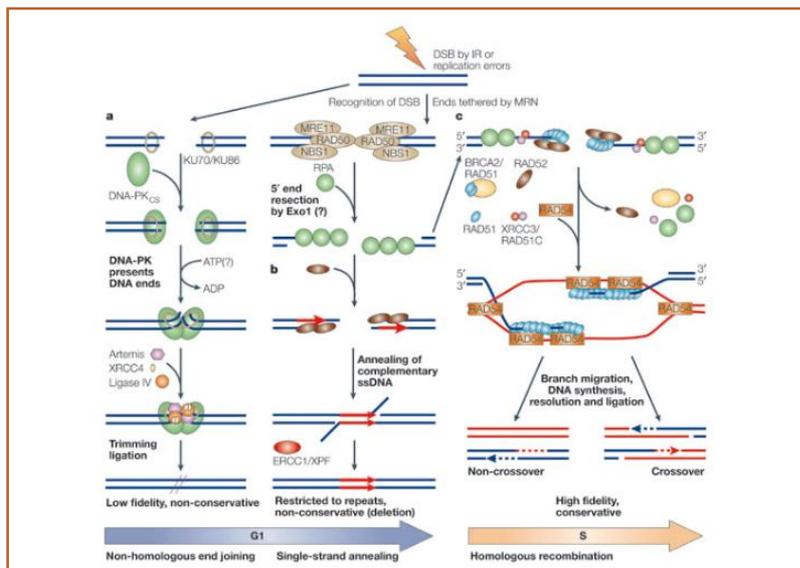
APE1 y PNKP son necesarios para el procesamiento de los extremos de los SSBs inducidos por la RI



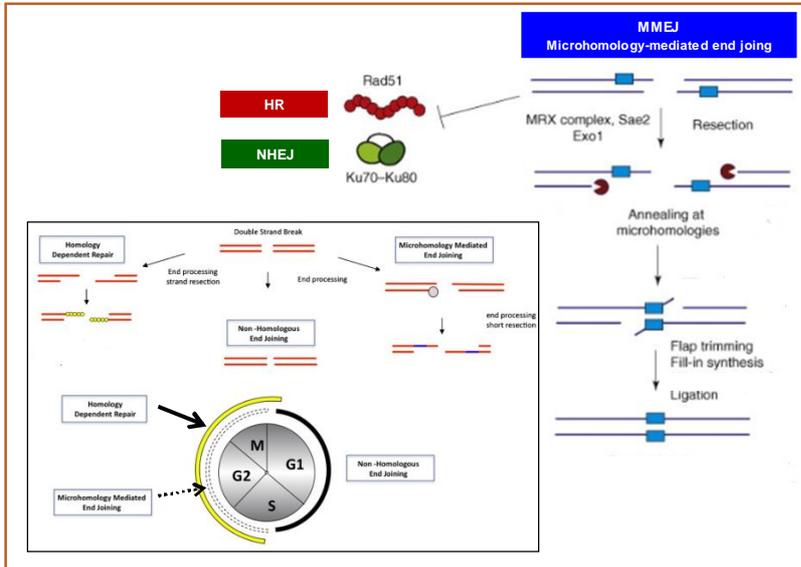
Reparación de DSBs



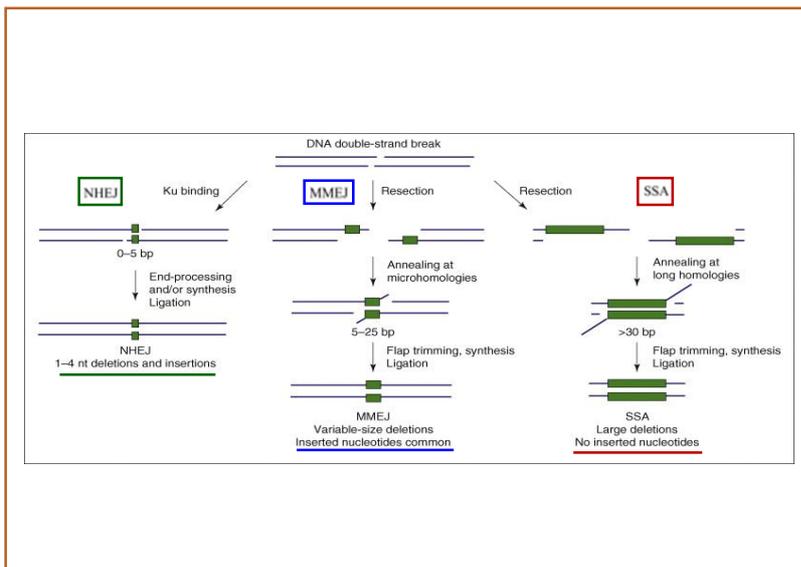
Reparación de DSBs



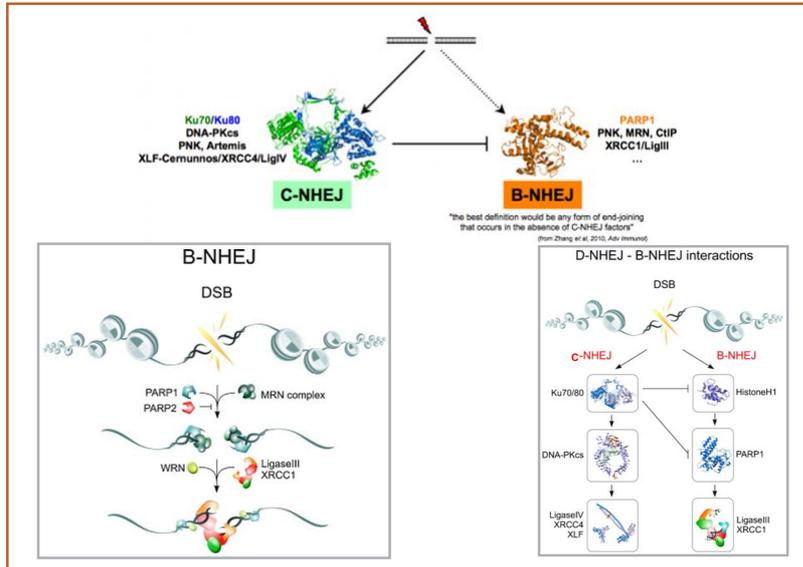
Reparación de DSBs



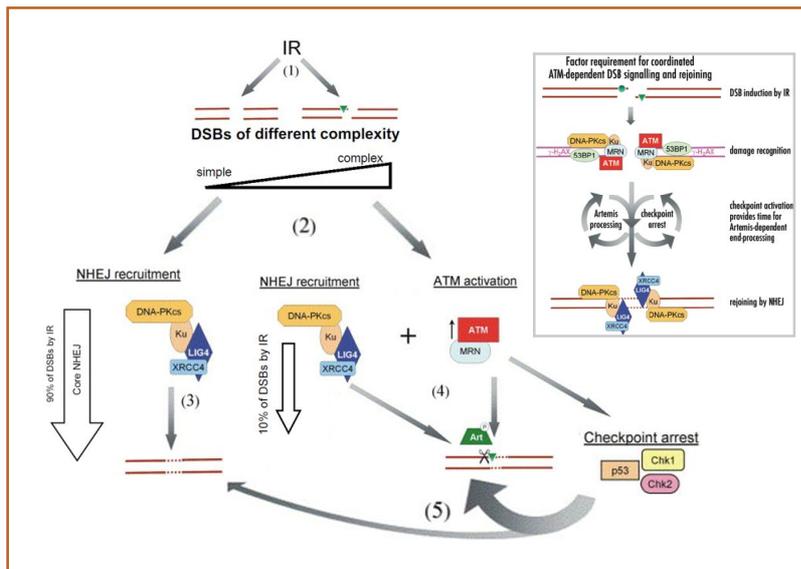
Reparación de DSBs



Reparación de DSBs

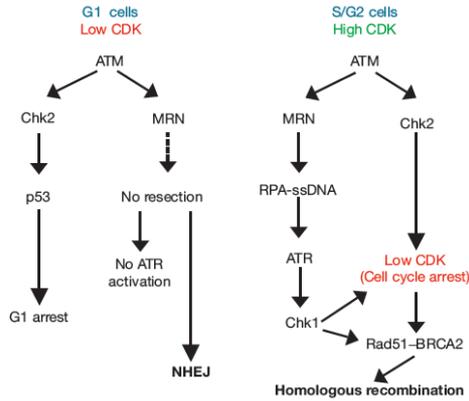


Respuesta celular a los DSBs inducidos por las RI



Respuesta celular a los DSBs inducidos por las RI

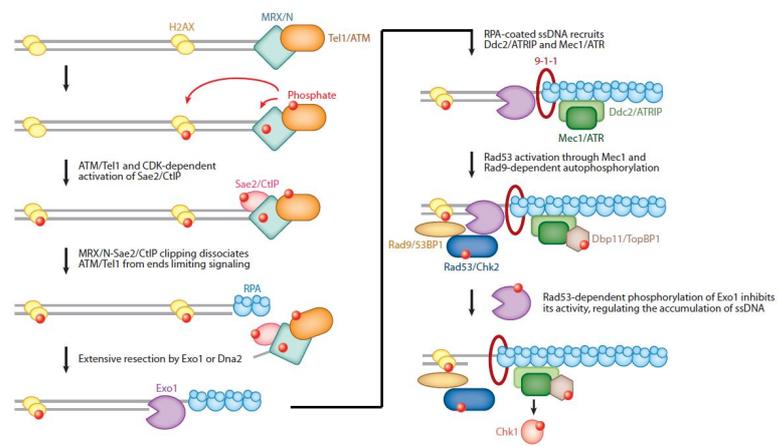
ATM interviene en la vía de reparación NHEJ cuando los DSBs ocurren en la fase G1



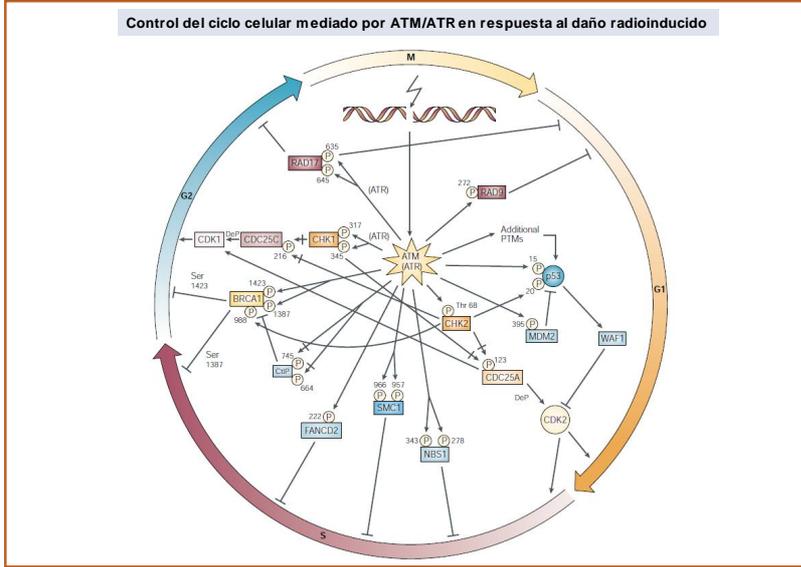
ATM es necesario tanto para la activación de la vía ATR-Chk1 como para iniciar la reparación del ADN mediante recombinación homóloga (HRR), promoviendo la formación de ADN de cadena sencilla en los sitios de daño a través de la resección nucleolítica

Respuesta celular a los DSBs inducidos por las RI

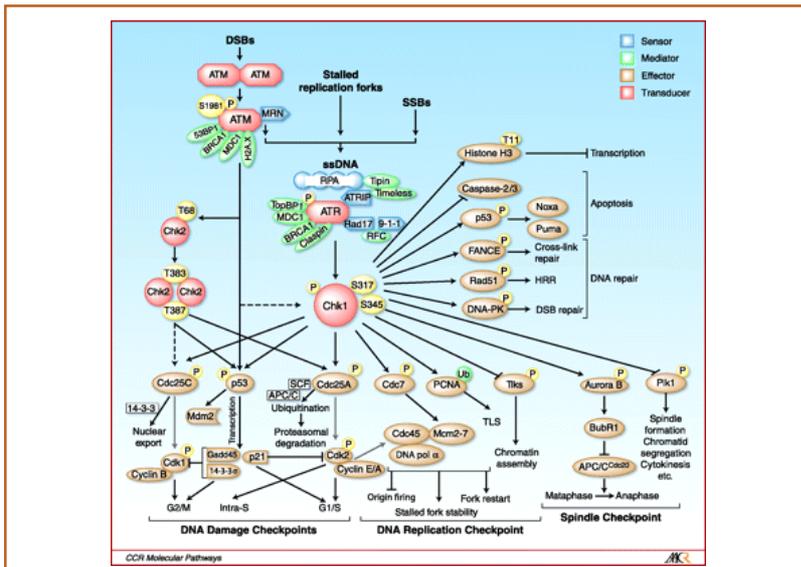
ATM es necesario tanto para la activación de la vía ATR-Chk1 como para iniciar la reparación del ADN mediante recombinación homóloga (HRR), promoviendo la formación de ADN de cadena sencilla en los sitios de daño a través de la resección nucleolítica



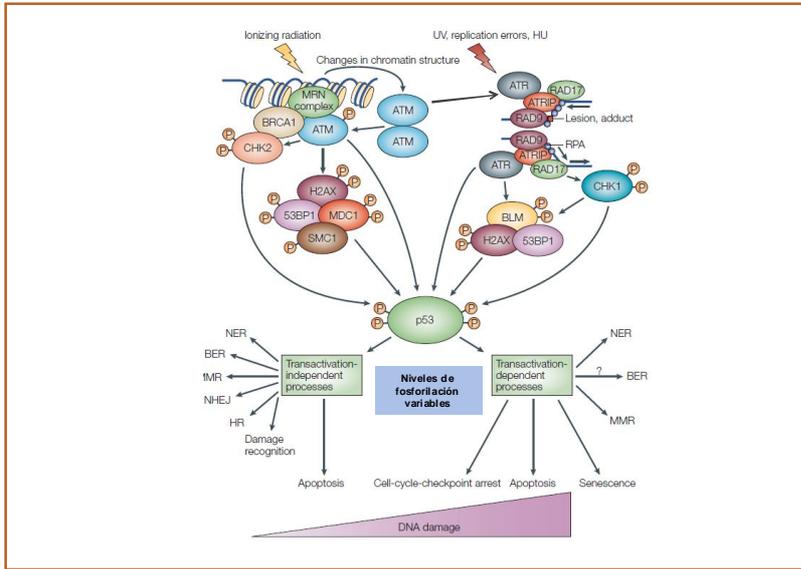
Respuesta celular a los DSBs inducidos por las RI



Respuesta celular a los DSBs inducidos por las RI

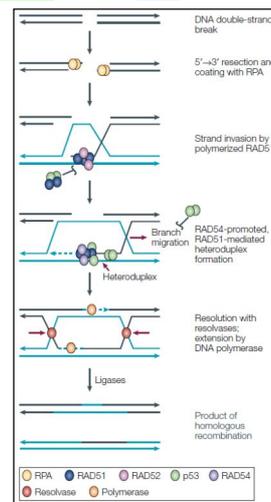
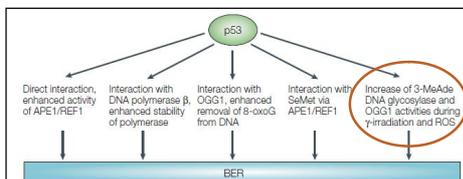


Papel de p53 en el control del daño en el ADN radioinducido

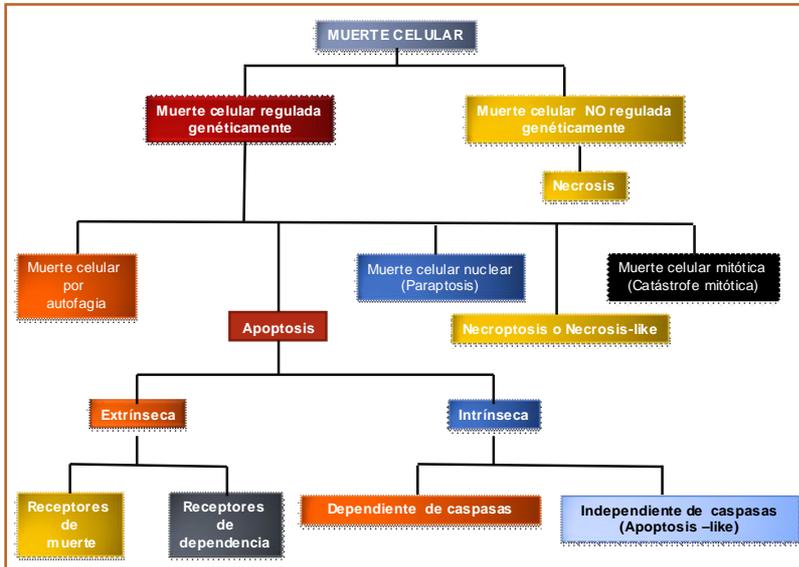


Papel de p53 en el control del daño en el ADN radioinducido

Ejemplos de funciones de p53 independientes de transactivación

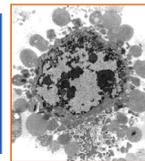


Tipos de muerte celular



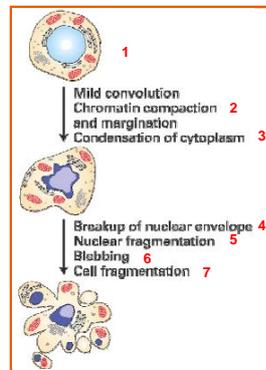
¿Qué es la apoptosis?

- Forma **fisiológica** de muerte celular
 - Se desencadena por múltiples **estímulos**
 - Esencial en los procesos de **desarrollo**
 - Su alteración puede **promover cáncer, autoinmunidad y desórdenes degenerativos**
- Acuñaado por Kerr, Wyllie & Currie (Kerr et al. *Br J Cancer*, 1972)
- Apoptosis no es sinónimo de muerte celular programada ni de activación por caspasas



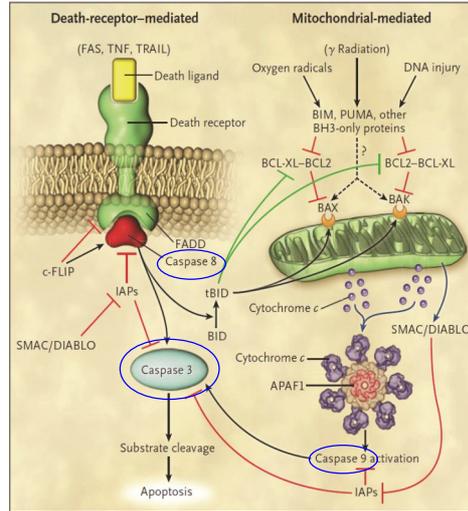
Cambios morfológicos asociados al fenotipo apoptótico:

1. Redondeo de la célula
2. Reducción del volumen nuclear (condensación de la cromatina)
3. Reducción del volumen celular (condensación del citoplasma)
4. Rotura de la membrana nuclear
5. Fragmentación nuclear
6. Granulación de la membrana plasmática
7. Fragmentación celular (cuerpos apoptóticos)
8. Requiere energía y afecta a células individuales



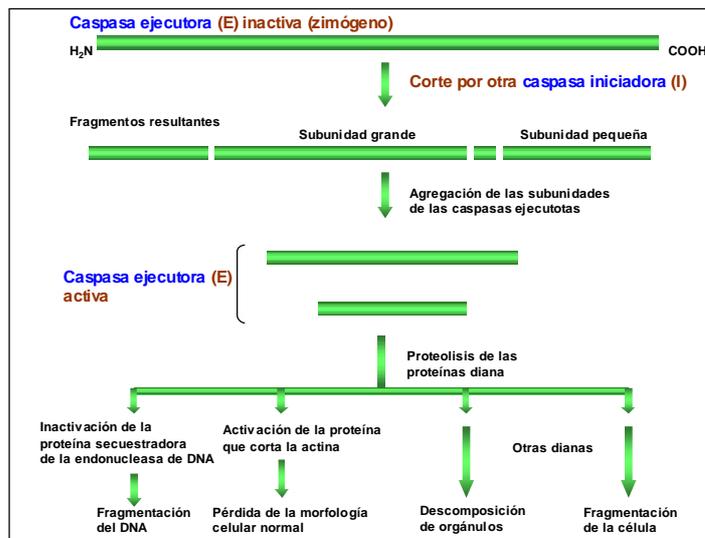
Rutas apoptóticas

Receptores de muerte (DR) - Extrínseca



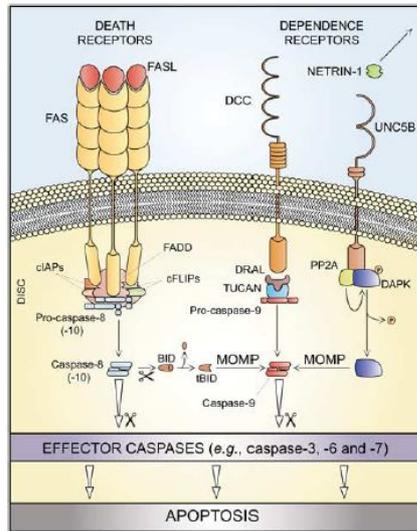
Mitocondria - Intrínseca

Rutas apoptóticas



Apoptosis extrínseca

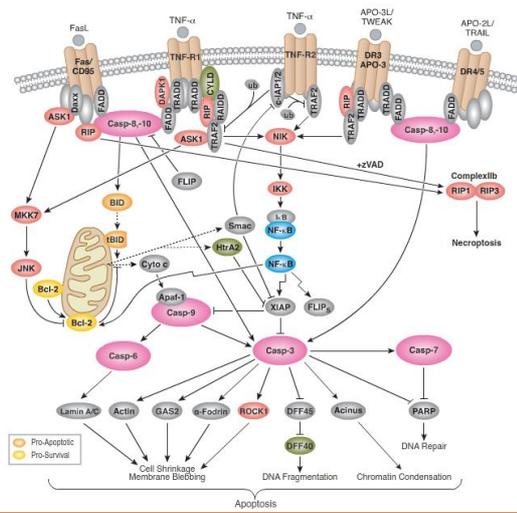
Apoptosis extrínseca por receptores de muerte



Apoptosis extrínseca por receptores de dependencia

Apoptosis extrínseca

Death Receptor Signaling

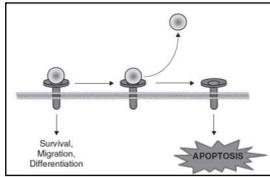


Apoptosis extrínseca

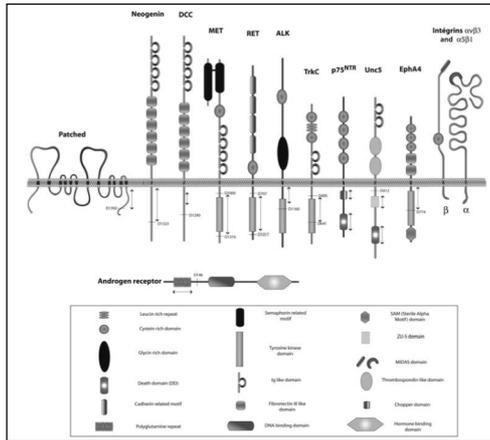
Receptores de dependencia

Se caracterizan por su capacidad para activar la señalización de dos vías opuestas.

En presencia de ligando, estos receptores activan las vías clásicas de señalización implicadas en la supervivencia celular, la migración y la diferenciación.

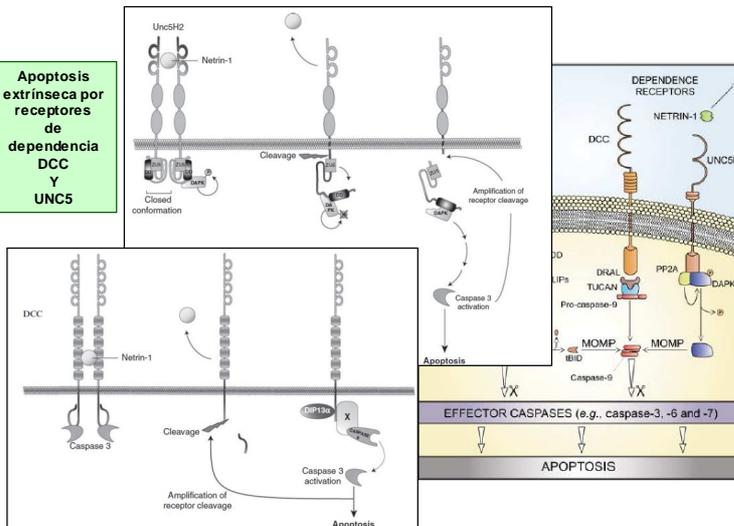


En ausencia de ligando no se quedan inactivos, sino que provocan una señal apoptótica

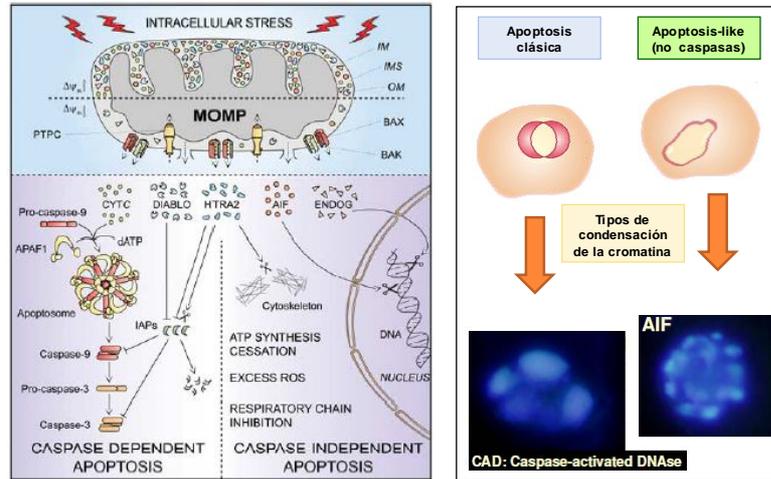


Apoptosis extrínseca

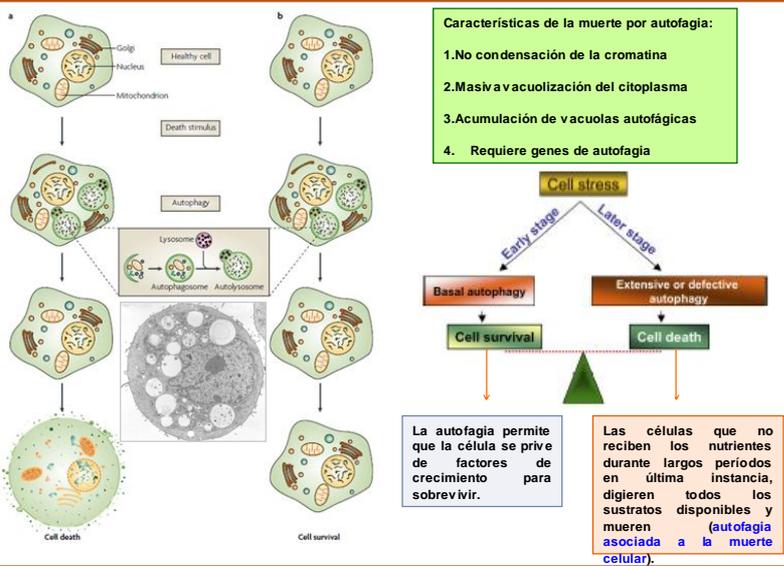
Apoptosis extrínseca por receptores de dependencia DCC Y UNC5



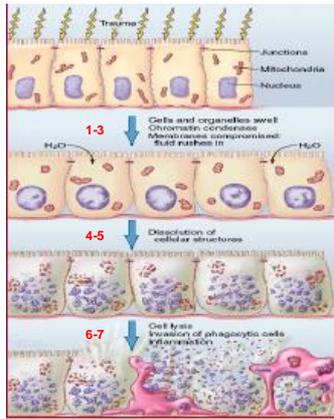
Apoptosis intrínseca



Autofagia asociada a la muerte celular

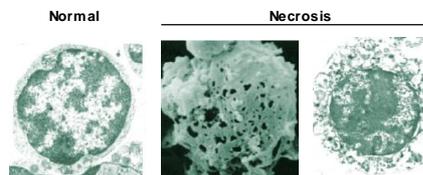


Necrosis

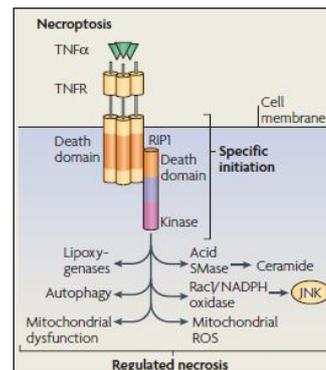
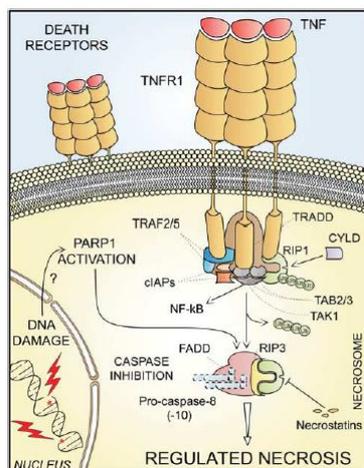


Características de la muerte por necrosis:

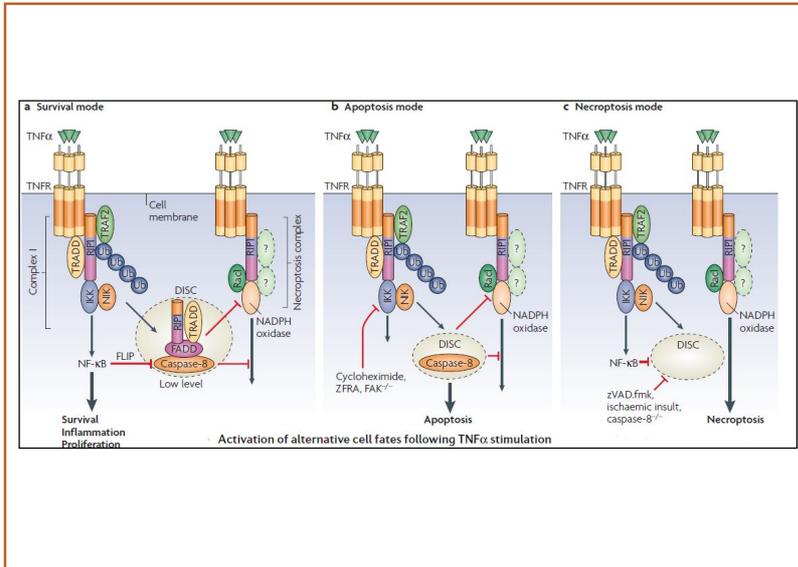
1. Aumento del volumen citoplásmico
2. Aumento del volumen de los orgánulos celulares
3. Moderada condensación de la cromatina
4. Lisis nuclear sin fragmentación específica de la cromatina
5. Aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática
6. Rotura de la membrana plasmática
7. Respuesta inflamatoria
8. No requiere energía y afecta a grupos de células contiguas



Necroptosis o forma regulada de muerte por necrosis

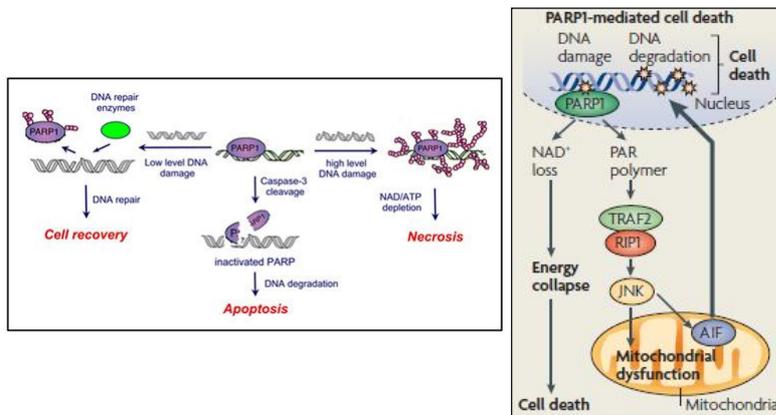


Necroptosis o forma regulada de muerte por necrosis



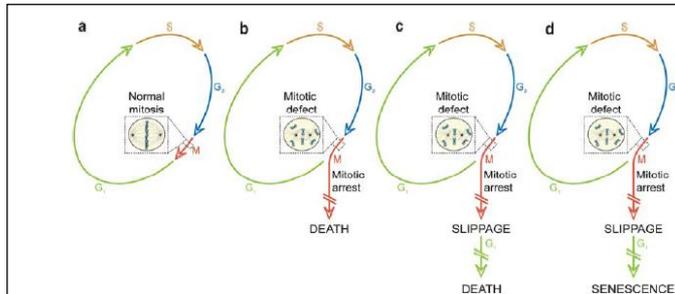
Muerte celular nuclear o paraptosis

La muerte celular nuclear está regulada por PARP1 y se asemeja morfológicamente a la necrosis



Muerte celular mitótica o catástrofe mitótica

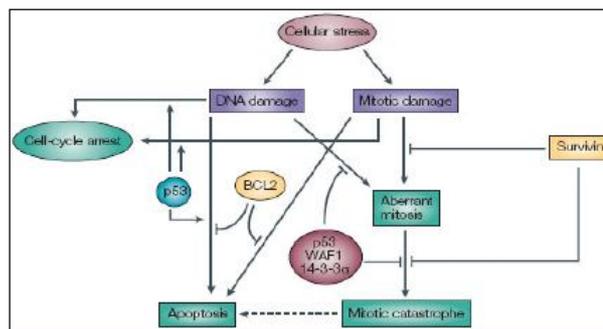
La catástrofe mitótica se refiere a los casos de muerte celular que se activan cuando ocurre una mitosis aberrante y que se ejecutan bien durante la propia mitosis o en la interfase posterior



Características de la muerte celular mitótica

1. Implica micro y multinucleación
2. Ocurre como consecuencia de alteraciones en los puntos de control del ciclo celular y del daño en el ADN
3. No es en sí misma un mecanismo de muerte celular, sino una vía oncosupresora distinta de las rutas de muerte celular o senescencia

Muerte celular mitótica o catástrofe mitótica



SURVIVINA:

- Expresada en las fases G₂ y M del ciclo celular
- Asociada con los microtúbulos del huso mitótico
- Regula la segregación de los cromosomas
- Necesaria para el mantenimiento del punto de control del huso

INACTIVACION de la SURVIVINA da lugar a la aparición de mitosis aberrante

SOBREEXPRESION de la SURVIVINA confiere resistencia a la muerte. Esta elevada en células tumorales

PARTE III BAJAS DOSIS DE RI Y RESPUESTA ADAPTATIVA

¿Qué se entiende por respuesta adaptativa?

Respuesta adaptativa (RA): es un mecanismo biológico de defensa por el que la exposición de una célula a una situación de estrés, como puede ser la radiación, estimula sus sistemas de defensa natural, protegiéndola contra posteriores situaciones de estrés.

Experimentalmente, la RA se ha estudiado mediante la exposición de las células a una **dosis baja de radiación** para inducir la **respuesta adaptativa (dosis condicionante)**, seguida de una **dosis de prueba alta (dosis provocadora)** y la comparación de dicha respuesta con la de una exposición a una dosis alta de radiación: **Respuesta Radioadaptativa (RRA)**

La RRA se ha demostrado en células de mamífero *in vitro* e *in vivo* después de exposiciones **agudas** y **prolongadas** a radiación X o gamma

Radio-Adaptive Response (RAR)



Significant **reduction in thymocyte apoptotic induction** when RAR was compared with an acute radiation exposure of 1.75 Gy

Otros criterios de valoración:

- Aparición de aberraciones cromosómicas
- Inducción de mutaciones
- Formación de micronúcleos
- Tasa de reparación
- Incidencia de tumores
- Periodo de latencia tumoral
- Supervivencia del individuo

Respuesta radioadaptativa

Dos parámetros fundamentales definen el fenómeno radioadaptativo:

- (i) La **dosis condicionante** que es requerida para inducir de manera efectiva una vía de señalización radioprotectora
- (ii) El **intervalo de tiempo** que tiene que transcurrir **entre** la exposición a la dosis **condicionante** y **dosis provocadora**

La RRA se produce a **dosis condicionantes** de radiación que oscilan entre **0,01 y 0,5 Gy** o bien a tasas de dosis que van desde **0,01 hasta 1,0 Gy min⁻¹**

La RRA resulta **más beneficiosa** a dosis **<100 mGy**, **comienza a desaparecer** a dosis **>200 mGy** y **rara vez se ve** a una dosis **>500 mGy**

La RRA es un fenómeno con un **alto grado de variación intra e interindividual**:

- (i) Tasa de dosis
- (i) Tiempo transcurrido entre dosis
- (ii) Variación genética entre individuos**

Efecto Yonezawa

Dosis condicionante		Dosis provocadora	
0,05 Gy	← 2 meses →	8 Gy	Si RRA
0,3-0,5 Gy	← 2 semanas →	8 Gy	Si RRA
0,2 Gy	← 2 a 5 meses →	8 Gy	No RRA
0,025 Gy	← > 2 meses →	8 Gy	No RRA

Modelos animales de respuesta radioadaptativa

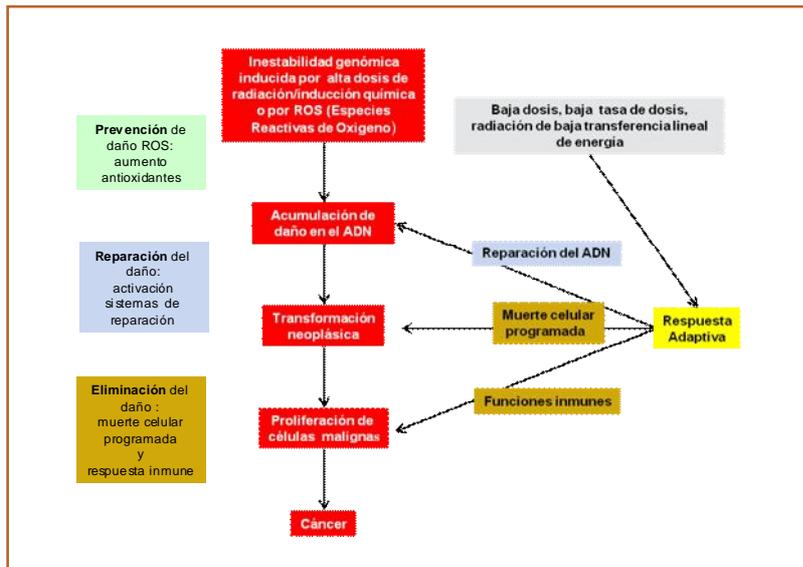
Animal	Priming dose	Priming dose rate	Challenging dose	Challenging dose rate	Number of animals	End point	Remarks
Female C57BL/6N Jcl mice	A: no	A: no	A: 4 times	A: 2.0 Gy/min	A: 30	Number of thymic lymphomas	Suppression of thymic lymphoma induction (A) in B and C, no lymphomas in group D
	B: 0.075 Gy X-rays	B: 2.0 Gy/min	B: 1.8 Gy X-rays	B: 2.0 Gy/min	B: 22		
	C: Continuous 1.2 mGy/h ¹³⁷ Cs-γ	C: 1.2 mGy/h ¹³⁷ Cs-γ	C: 4 times 1.8 Gy X-rays	C: 2.0 Gy/min	C: 32		
	D: Continuous 1.2 mGy/h ¹³⁷ Cs-γ	D: 1.2 mGy/h ¹³⁷ Cs-γ	D: no	D: no	D: 20		
	E: no	E: no	E: sham	E: no	E: 20		
Female F1Trp53 (+/-) or wild type (+/+) mice	A(+/+): no	A: no	A: no	A: no	A: 159	Number of thymic lymphomas	Trp53 mice are radiation-sensitive and cancer-prone, low-dose radiation increased the latency of tumours
	B(+/-): no	B: no	B: no	B: no	B: 174		
	C(+/-): 10 mGy ⁶⁰ Co γ	C: 0.5 mGy/min	C: no	C: no	C: 167		
	D(+/-): 100 mGy ⁶⁰ Co γ	D: 0.5 mGy/min	D: no	D: no	D: 168		
	E(+/-): no	E: no	E: 4 Gy ⁶⁰ Co γ	E: 0.5 Gy/min	E: 191		
pKZ1 mice	A: no	A: no	A: 2 Gy X-rays	A: 0.15 Gy/min	Controls/Treated	Chromosomal inversions	From 10 to 1 mGy a reduction below endogenous inversion frequency
	B: no	B: no	B: 100 mGy	B: as A	A: 5/8		
	C: 10 mGy X-rays	C: 0.15 Gy/min	C: no	C: no	B: 10/10		
	D: 1 mGy X-rays	D: 0.15 Gy/min	D: no	D: no	C: 20/20		

Respuesta radioadaptativa ambiental y ocupacional

Type of exposure	Cell type	Challenging dose	Challenging dose rate	End point	Exposed/controls	Remarks
Environmental	Peripheral blood lymphocytes	1.5 Gy	Not given	Chromosomal aberrations	21/14	Presumed that cells already primed <i>in vivo</i>
Environmental	Peripheral blood lymphocytes	0.3, 1, 2, 4 Gy	0.5 Gy/min	Alkaline comet assay	33/40	Priming dose <i>in vivo</i> : low (<10.2 mSv/year) or high (>10.2 mSv/year).
Occupational (medical workers)	Peripheral blood lymphocytes	2 Gy	0.95 Gy/min	Chromosomal aberrations (dic, ace, csb)	12/8	Presumed that cells already primed <i>in vivo</i>
Occupational (medical workers)	Peripheral blood lymphocytes	0, 1 or 2 Gy ⁶⁰ Co- γ	0.72 Gy/min	Micronuclei	24/13	Presumed that cells already primed <i>in vivo</i>
Occupational (nuclear workers)	Peripheral blood lymphocytes	3.5 Gy	1 Gy/min or 4 mGy/min	Micronuclei	Total of 41, <i>in vivo</i> priming dose varying from 0 to 10 mSv	Two blood samples from the same person before and after <i>in vivo</i> exposure compared
Environmental (A-bomb)	Peripheral blood lymphocytes	1 Gy	0.27 cGy/min or 1.62 cGy/min	Alkaline comet assay	2/8	1.5–2 Gy <i>in vivo</i> exposure. Cells primed <i>in vitro</i> with 10 mGy ¹³⁷ Cs γ or 2.5 mGy ²⁵² Cf neutrons, respectively
Environmental (Chernobyl)	Peripheral blood lymphocytes	1.5 Gy γ	0.10 Gy/min	Chromosomal aberrations	13/4	Presumed that cells already primed <i>in vivo</i> . Difficulties to estimate the total overall priming dose, ground contamination 12–30 Ci/km ²
Environmental (Chernobyl)	Peripheral blood lymphocytes	2.5 μ g/ml bleomycin		Chromosomal aberrations	15/7	Presumed that cells already primed <i>in vivo</i> . Difficulties to estimate the total overall priming dose, ground contamination 12–30 Ci/km ²

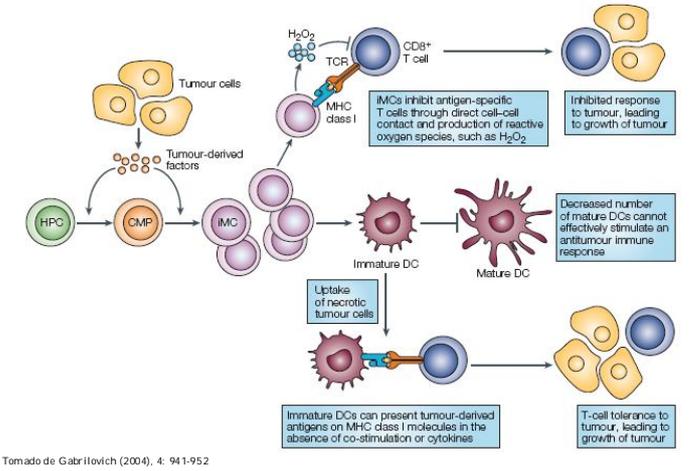


Mecanismos implicados en la respuesta radioadaptativa

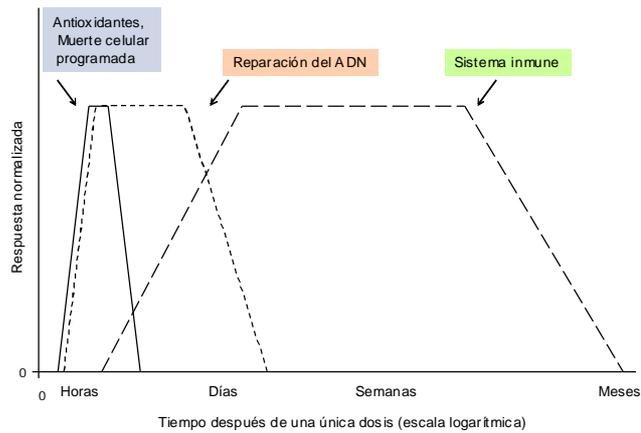


La respuesta adaptativa provoca una estimulación inmunológica

Consecuencias funcionales de una diferenciación incorrecta de las DCs en cáncer



Patrón temporal de activación de los sistemas de protección asociados a la respuesta radioadaptativa

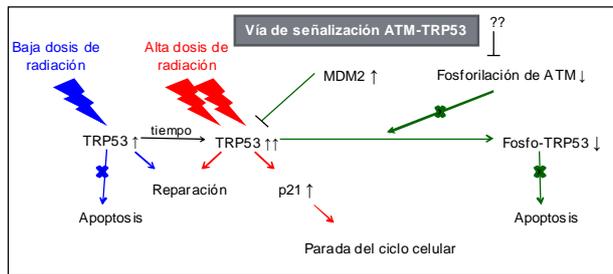


Factores genéticos implicados en la respuesta radioadaptativa

Dos perfiles transcripcionales contrapuestos asociados a la respuesta radioadaptativa en líneas celulares humanas de origen linfoblásteo

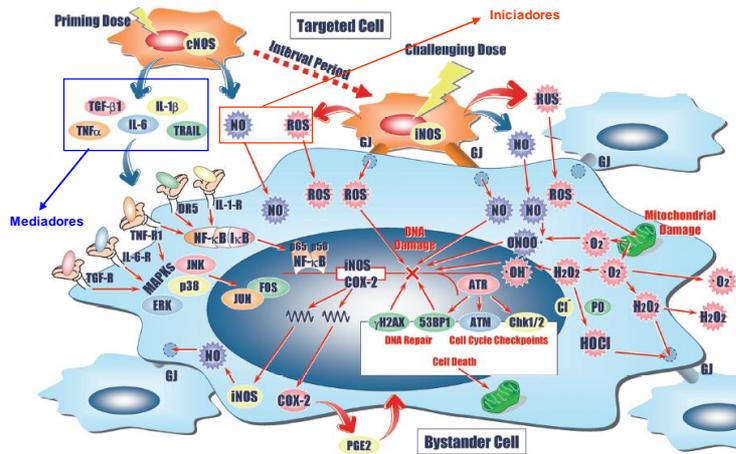
Expresión reducida	Expresión aumentada
Genes implicados en: -Proliferación celular -Señales de transducción mitogénicas -Apoptosis -Sistemas de reparación de DSBs	Genes implicados en: -Control negativo del ciclo celular -Señales de transducción antimitogénicas -Respuesta a situaciones de estrés celular -Sistemas de reparación BER (Parp1, APE1)

En las células radioadaptadas ocurren mayoritariamente SSBs o modificaciones de bases más que DSBs



Contribución del efecto "Bystander" a la respuesta radioadaptativa

Posible mecanismo implicado en la relación efecto "bystander"-respuesta radioadaptativa



Etapas fundamentales de la respuesta radioadaptativa

La respuesta radioadaptativa se puede dividir en tres procesos biológicos sucesivos:

(i) la respuesta adaptativa intracelular



(ii) las señales extracelulares promovidas por las células irradiadas que inducen la adaptación de las células "bystander"



(iii) el mantenimiento del status radioadaptativo



GRACIAS POR SU ATENCION

