



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση τελομερικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA»

ΒΕΡΟΝΙΚΗ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑ ΤΣΕΡΝΤΙΝΤΣΕΒΑ

A.M.: 41601

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δημήτριος Στραβοπόδης, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας,
ΕΚΠΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Σαράντης Γκάγκος, Ερευνητής Β', Ίδρυμα
Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

2018

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση τελομερικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA»

ΒΕΡΟΝΙΚΗ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑ ΤΣΕΡΝΤΙΝΤΣΕΒΑ

A.M.: 41601

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Δημήτριος Στραβοπόδης, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ [επιβλέπων]
2. Σαράντης Γκάγκος, Ερευνητής Β', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών [επιστημονικός υπεύθυνος]
3. Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ: Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Στη μητέρα μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Ερευνητική Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» των Τμημάτων Βιολογίας και Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Εργαστήριο Χρωμοσωμικής Αστάθειας και Τελομερικής Δυσλειτουργίας στον Καρκίνο, Κέντρο Κλινικής Πειραματικής & Μεταφραστικής Έρευνας, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ, κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2017-Νοέμβριος 2018.

Η εν λόγω μελέτη περατώθηκε υπό την εποπτεία του Δρ. Γκάγκου Σαράντη, Ερευνητή Β' και επικεφαλή του Εργαστηρίου Χρωμοσωμικής Αστάθειας και Τελομερικής Δυσλειτουργίας στον Καρκίνο, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, εποπτεία κατά την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο, αλλά κυρίως για την γνωριμία μου με έναν συναρπαστικά μαγικό κόσμο της επιστήμης της Βιολογίας, τη Βιολογία των τελομερών.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον επιβλέποντα της Διπλωματικής μου Εργασίας, Δρ. Στραβοπόδη Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την υποστήριξη, εμπιστοσύνη και καθοδήγηση, καθώς και την κ. Παπασιδέρη Ισιδώρα, Καθηγήτρια του ίδιου Τμήματος, μέλους της τριμελούς επιτροπής μου για την στήριξή της. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Dr. Wojciech Niedzwiedz, Καθηγητή στο Institute of Cancer Research, ICR στο Λονδίνο, σημαντικότατο συνεργάτη μας, για την καθολική υποστήριξή του στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω και τον Dr Thanos Halazonetis, Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο της Γενεύης, για την επιστημονική και καθολική καθοδήγηση στο χρονικό αυτό διάστημα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τελειόφοιτη υποψήφια διδάκτωρ Ρουμελιώτη Φανή-Μάρλεν, για τη βοήθειά της τους πρώτους μήνες που ήταν παρούσα στο εργαστήριο, αλλά και τους υπόλοιπους κατά τη διάρκεια των οποίων ήταν πρόθυμη να με στηρίξει, τη Μαρία Χιουρέα, τέως τεχνικό του εργαστηρίου, τη Δρ Χριστίνα Ραφτοπούλου, μεταδιδάκτορα, για τη βοήθειά της, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα

μέλη του Εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα το οποίο δημιούργησαν. Ευχαριστώ επίσης τον Dr Aaron Mendez-Bermudez, μεταδιδακτορικό ερευνητή στο εργαστήριο του Dr Eric Gilson, Καθηγητή στο IRCAN, Νίκαια, Γαλλία, για τη συνεργασία του σε σχετική εργασία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ Θοδωρή Ράμπια, μεταδιδακτορικό ερευνητή στο IIBEAA, ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να συμπαρασταθεί και βοηθήσει κατά τη διάρκεια της εν λόγω μελέτης.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Κοινωφελές Ίδρυμα Ιωάννη Σ. Λάτση για τη στήριξή του μέσω της υποτροφίας μου για την διεκπεραίωση των Μεταπτυχιακών μου σπουδών τα δύο αυτά έτη, καθώς επίσης και το Κοινωφελές Ίδρυμα Αλεξανδρου Ωνάση για την κάλυψη των διδάκτρων ενός εκ των δύο ετών μέσω υποτροφίας. Η στήριξή τους αποτέλεσε ιδιαίτερα σημαντική βοήθεια κατά το διάστημα των σπουδών μου.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το σημαντικότερο άνθρωπο στη ζωή μου, τη μητέρα μου, Ταμάρα, για τη υποστήριξή της όλα αυτά τα χρόνια. Παρά τις όποιες δυσκολίες, είναι εκείνη η οποία μου δίνει δύναμη να συνεχίζω να προσπαθώ να επιτύχω. Υπερευχαριστώ, τέλος, τον φίλο μου Σταύρο, ο οποίος βρίσκεται πάντα δίπλα μου και με εμπυχώνει.

Αθήνα, 30.10.2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το 10-15% των καρκίνων βασίζεται στον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών, ALT (Alternative Lengthening of Telomeres). Μεταξύ άλλων, ο ALT χαρακτηρίζεται από ετερογενές μήκος τελομερών, εξωχρωμοσωμικές τελομερικές επαναλήψεις, και αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των -συσχετιζόμενων με τον ALT-PML πυρηνικών σωματίων, APBs. Ο μηχανισμός ALT στην ανθρώπινη νεοπλασία βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, συνδέεται με συντηρητική διαδικασία αντιγραφής του DNA, και προσομοιάζει στο μηχανισμό ανασυνδυαστικής επιδιόρθωσης μονόπλευρων διπλόκλωνων θραύσεων του DNA, BIR (Break-Induced Replication). Η πρωτεΐνη EXD2 αποτελεί μη-επαρκώς χαρακτηρισμένη εξωνουκλεάση που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο MRN και εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό. Στην ALT κυτταρική σειρά ανθρώπινου οστεοσαρκώματος U2OS, η EXD2 σχηματίζει διακριτά πυρηνικά κοκκία τα οποία συχνά συνεντοπίζονται με την ειδική για το τελομερές πρωτεΐνη TRF2, τις τελομερικές αλληλουχίες, και τα APBs. Επιπροσθέτως, η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή, ενώ καταστέλλει το κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό (c-HR). Η απουσία της EXD2 αυξάνει τον αριθμό των ακάλυπτων χρωμοσωμικών άκρων και προκαλεί ελάττωση του μήκους των τελομερών στα ALT κύτταρα. Επιπλέον, φαίνεται ότι η EXD2 καταστέλλει τη βιογένεση των ALT-χαρακτηριστικών C-κύκλων, και αναστέλλει τη βιογένεση των APBs. Παρά τον σχηματισμό χρωμοσωμικών θραύσεων στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2, τα ποσοστά των συντήξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων εμφανίζονται ελαττωμένα, υποδηλώνοντας πιθανό ρόλο της EXD2 στον μηχανισμό MMEJ. Πράγματι, η απουσία της EXD2 προστατεύει από τις -προκαλούμενες από την αντιμορφική μετάλλαξη (dominant negative) TRF2^{ΔM/ΔB} του TRF2- τελομερικές συντήξεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν νέες λεπτομέρειες στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών μηχανισμών επιδιόρθωσης και επιμήκυνσης των ALT τελομερών, αναδεικνύοντας την EXD2 ως πιθανό μελλοντικό στόχο θεραπευτικών στρατηγικών για την καταπολέμηση του καρκίνου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Τελομερή, Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης τελομερών, ALT, EXD2, Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA, Γενωμική αστάθεια, Καρκίνος

ABSTRACT

The Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) is a homology-mediated pathway of telomere elongation that sustains continuous cell growth in 10-15% of human cancers. Among others, ALT is characterized by the presence of highly heterogeneous telomere lengths, extrachromosomal telomeric repeats, as well as increased frequency of telomere-associated promyelocytic leukemia protein bodies (APBs). The mechanism underlying ALT in human neoplasia is a conservative DNA replication process, orchestrated by Break-induced replication (BIR). EXD2 is a largely uncharacterized MRN-interacting exonuclease that facilitates homology-mediated DNA repair. In the ALT human osteosarcoma cell line U2OS, EXD2 forms distinct nuclear foci which frequently colocalize with the telomere specific protein TRF2, the telomeric repeats *per se*, and the APBs. Moreover, EXD2 functions as an exonuclease at the ALT telomeres, and suppresses classical homology-mediated recombination (c-HR). The absence of EXD2 increases the number of telomere free ends and reduces the overall length of telomeres. In addition, it appears that EXD2 suppresses the biogenesis of C-circles, as well as the production of APBs. Despite chromosome breakage in cells lacking EXD2, the rates of chromosome end-fusions are minimal, suggesting an important role of EXD2 in telomeric alt-EJ. Indeed, high rates of chromosome end-fusions -induced upon expression of a dominant negative TRF2^{ΔB/ΔM} form of TRF2-, are rescued in ALT cells lacking EXD2. The above results bring new insight into the complex interactions between different repair machineries and the recombinatorial telomere elongation of ALT telomeres, highlighting EXD2 as a potential target for future therapeutic strategies to combat cancer.

SUBJECT AREA: Biology

KEYWORDS: Telomeres, Alternative lengthening of telomeres, ALT, EXD2, DNA repair, Genomic instability, Cancer

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|--|----|
| 1. Εισαγωγή..... | 17 |
| 1.1. Δομή και λειτουργία γονιδιώματος..... | 17 |
| 1.2. Τελομερή Θηλαστικών..... | 21 |
| 1.2.1. Δομή τελομερών..... | 21 |
| 1.2.2. Η t-θηλειά, t-loop..... | 22 |
| 1.2.3. Το σύμπλοκο της σελτερίνης..... | 24 |
| 1.3. Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA..... | 26 |
| 1.3.1. Μη ομόλογη σύνδεση των άκρων, NHEJ..... | 27 |
| 1.3.1.1. Κανονικός μηχανισμός μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, c- NHEJ..... | 27 |
| 1.3.1.2. Εναλλακτικός μηχανισμός μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, alt-NHEJ/b-NHEJ..... | 28 |
| 1.3.1.3. Εναλλακτικός μηχανισμός σύνδεσης των άκρων, alt- NHEJ/MMEJ..... | 29 |
| 1.3.2. Όμολογος ανασυνδυασμός, HR..... | 30 |
| 1.3.2.1. Μηχανισμός επιδιόρθωσης DSB, DSBR..... | 31 |
| 1.3.2.2. Εξαρτώμενη από τη DNA σύνθεση ανασύνδεση κλώνου, SDSA..... | 33 |
| 1.3.2.3. Ανασύνδεση μονού κλώνου, SSA..... | 35 |
| 1.3.2.4. Εναλλακτική σύνδεση των άκρων/διαμεσολαβούμενη από μικροομολογία σύνδεση των άκρων, alt-EJ/MMEJ..... | 36 |
| 1.3.2.5. Επαγόμενη από θραύσεις αντιγραφή, BIR..... | 37 |
| 1.4. Το όριο Hayflick και το «πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων»..... | 40 |
| 1.5. Μηχανισμοί επιμήκυνσης των τελομερών..... | 41 |
| 1.5.1. Επιμήκυνση των τελομερών μέσω της τελομεράσης..... | 41 |
| 1.5.2. Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών, ALT..... | 42 |
| 1.6. Ο ρόλος της πρωτεΐνης EXD2 στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA..... | 48 |
| 1.7. Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 2. Υλικά και Μέθοδοι..... | 52 |
| 2.1. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών..... | 53 |
| 2.1.1. Υλικά..... | 53 |
| 2.1.2. Μέθοδος..... | 53 |
| 2.2. Συλλογή μεταφασικών χρωμοσωμάτων..... | 54 |
| 2.2.1. Υλικά..... | 54 |
| 2.2.2. Μέθοδος..... | 54 |
| 2.3. Φθορίζουσα <i>in situ</i> υβριδοποίηση, FISH..... | 55 |
| 2.3.1. Υλικά..... | 55 |
| 2.3.2. Μέθοδος..... | 55 |
| 2.4. Προσδιορισμός χρωμοσωμικού προσανατολισμού με φθορίζουσα <i>in situ</i> υβριδοποίηση, CO-FISH..... | 57 |
| 2.4.1. Υλικά..... | 57 |
| 2.4.2. Μέθοδος..... | 57 |
| 2.5. Ποσοτικοποίηση τελομερικού μήκους με τη μέθοδο Q-FISH, βασισμένη στην φθορίζουσα <i>in situ</i> υβριδοποίηση, FISH..... | 59 |
| 2.5.1. Υλικά..... | 59 |
| 2.5.2. Μέθοδος..... | 59 |
| 2.6. Φθορίζουσα <i>in situ</i> υβριδοποίηση μη αποδιατακτικών συνθηκών, ND- FISH..... | 60 |
| 2.6.1. Υλικά..... | 60 |
| 2.6.2. Μέθοδος..... | 60 |
| 2.7. Ανοσοφθορισμός, IF..... | 61 |
| 2.7.1. Υλικά..... | 61 |
| 2.7.2. Μέθοδος..... | 61 |
| 2.8. Φθορίζουσα <i>in situ</i> υβριδοποίησης συζευγμένη με ανοσοφθορισμό, IF- FISH..... | 62 |
| 2.8.1. Υλικά..... | 62 |
| 2.8.2. Μέθοδος..... | 63 |
| 2.9. Παραγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτήρια..... | 64 |
| 2.9.1. Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων, Transformation..... | 64 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.9.1.1. | Υλικά..... | 64 |
| 2.9.1.2. | Μέθοδος..... | 64 |
| 2.9.2. | Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασηματισμένων βακτηρίων..... | 64 |
| 2.9.2.1. | Υλικά..... | 64 |
| 2.9.2.2. | Μέθοδος..... | 65 |
| 2.9.3. | Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας πλασμιδιακού και γενωμικού DNA..... | 65 |
| 2.9.3.1. | Υλικά..... | 65 |
| 2.9.3.2. | Μέθοδος..... | 66 |
| 2.9.4. | Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας πλασμιδιακού και γενωμικού DNA..... | 66 |
| 2.9.4.1. | Υλικά..... | 66 |
| 2.9.4.2. | Μέθοδος..... | 66 |
| 2.9.5. | Ταυτοποίηση πλασμιδιακού DNA μέσω ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού..... | 67 |
| 2.9.5.1. | Υλικά..... | 67 |
| 2.9.5.2. | Μέθοδος..... | 68 |
| 2.10. | Παραγωγή lenti-ιού..... | 68 |
| 2.10.1. | Υλικά..... | 68 |
| 2.10.2. | Μέθοδος..... | 68 |
| 2.11. | Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με lenti-ιό..... | 70 |
| 2.11.1. | Υλικά..... | 70 |
| 2.11.2. | Μέθοδος..... | 70 |
| 2.12. | Μέθοδος C-Circle..... | 70 |
| 3. | Αποτελέσματα..... | 72 |
| 3.1. | Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase ⁺ κύτταρα..... | 73 |
| 3.2. | Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε αθανатоποιήμενα κύτταρα..... | 75 |
| 3.3. | Η EXD2 σχηματίζει πυρηνικά κοκκία στα ALT κύτταρα..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| 3.4. Τα πυρηνικά κοκκία της EXD2 στα ALT κύτταρα είναι εξαρτώμενα από τη βλάβη στο DNA..... | 78 |
| 3.5. Η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα..... | 79 |
| 3.6. Η EXD2 αποτελεί μέρος των συσχετιζόμενων με τον ALT σωμάτων PML, APBs..... | 82 |
| 3.7. Η EXD2 αναστέλλει τη βιογένεση των APBs | 84 |
| 3.8. Η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή..... | 85 |
| 3.8.1. Η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στον G-κλώνο στα τελομερή..... | 85 |
| 3.8.2. Η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή..... | 87 |
| 3.9. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 αυξάνει τα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA στα ALT κύτταρα..... | 89 |
| 3.10. Η υπερέκφραση της EXD2 καταστέλλει τον κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό c-HR στα τελομερή ALT κυττάρων..... | 91 |
| 3.11. Η EXD2 καταστέλλει τον κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό c-HR στο γονιδίωμα των ALT κυττάρων..... | 93 |
| 3.12. Η απουσία της EXD2 αυξάνει τον αριθμό των ακάλυπτων τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων (telomere free ends)..... | 94 |
| 3.13. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 ελαττώνει το μήκος των τελομερών στα κύτταρα ALT..... | 96 |
| 3.14. Η EXD2 προστατεύει από τις -προκαλούμενες από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2 ^{ΔM/ΔB} - συντήξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων στα ALT κύτταρα | 97 |
| 3.15. Η EXD2 συμμετέχει στη βιογένεση των C-Circles..... | 99 |
| 4. Συζήτηση..... | 103 |
| 5. Βιβλιογραφικές αναφορές..... | 111 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

| | | |
|-----------|---|----|
| Σχήμα 1: | Ο κυτταρικός κύκλος..... | 19 |
| Σχήμα 2: | Η δομή των τελομερών του ανθρώπου..... | 22 |
| Σχήμα 3: | Διαφορετικές αναπαραστάσεις της t-θηλειάς..... | 23 |
| Σχήμα 4: | Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο της σελετερίνης..... | 25 |
| Σχήμα 5: | Οι μηχανισμοί c-NHEJ και b-NHEJ..... | 29 |
| Σχήμα 6: | Το μονοπάτι επιδιόρθωσης διπλόκλωνων θραύσεων DSB..... | 32 |
| Σχήμα 7: | Το μονοπάτι επιδιόρθωσης εξαρτώμενης από τη DNA σύνθεση ανασύνδεσης κλώνου, SDSA..... | 34 |
| Σχήμα 8: | Το μονοπάτι επιδιόρθωσης ανασύνδεσης μονού κλώνου, SSA..... | 35 |
| Σχήμα 9: | Το μονοπάτι επιδιόρθωσης διαμεσολαβούμενης από μικρο-ομολογία σύνδεσης των άκρων, MMEJ..... | 37 |
| Σχήμα 10: | Το μονοπάτι επιδιόρθωσης επαγόμενης από θραύσεις αντιγραφή, BIR, το οποίο αποτελεί τον προτιμητέο μηχανισμό επιδιόρθωσης θραύσεων ενός ελεύθερου άκρου..... | 39 |
| Σχήμα 11: | Οι τρεις φάσεις της κυτταρικής καλλιέργειας, σύμφωνα με τον L. Hayflick..... | 40 |
| Σχήμα 12: | Εναλλακτικές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την μεσολαβούμενη από ανασυνδυασμό νεοσύνθεση του τελομερικού DNA..... | 44 |
| Σχήμα 13: | Μοντέλο ανασυνδυασμού και αντιγραφής των ALT τελομερών..... | 46 |
| Σχήμα 14: | Προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο της Rad52 στον BIR..... | 47 |
| Σχήμα 15: | Μοντέλο του πιθανού ρόλο της EXD2 στην καταστολή της γενωμικής αστάθειας..... | 50 |
| Σχήμα 16: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase ⁺ κύτταρα..... | 73 |
| Σχήμα 17: | Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase ⁺ κύτταρα..... | 74 |
| Σχήμα 18: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε σε αθανατοποιήμενα κύτταρα..... | 75 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Σχήμα 19: | Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε αθανатоποιημένα κύτταρα..... | 75 |
| Σχήμα 20: | Η EXD2 σχηματίζει πυρηνικά κοκκία στα ALT κύτταρα..... | 77 |
| Σχήμα 21: | Τα πυρηνικά κοκκία της EXD2 στα ALT κύτταρα είναι εξαρτώμενα από τη βλάβη στο DNA..... | 78 |
| Σχήμα 22: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται η συχνότητα συνεντοπισμών της EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα..... | 80 |
| Σχήμα 23: | Η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα..... | 80 |
| Σχήμα 24: | Μεγέθυνση της φωτογραφίας του σχήματος 23..... | 81 |
| Σχήμα 25: | Εναλλακτική εικόνα των συνεντοπισμών της EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα..... | 81 |
| Σχήμα 26: | Μεγέθυνση της φωτογραφίας του σχήματος 25..... | 82 |
| Σχήμα 27: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 αποτελεί μέρος των συσχετιζόμενων με τον ALT σωμάτων PML, APBs..... | 83 |
| Σχήμα 28: | Πυρήνας στον οποίο διακρίνεται ότι η EXD2 αποτελεί μέρος των συσχετιζόμενων με τον ALT σωμάτων PML, APBs..... | 83 |
| Σχήμα 29: | Η EXD2 αναστέλλει τη βιογένεση των APBs..... | 84 |
| Σχήμα 30: | Πυρήνες στους οποίους διακρίνεται ότι η EXD2 αναστέλλει τη βιογένεση των APBs..... | 85 |
| Σχήμα 31: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στον G-κλώνο στα τελομερή..... | 86 |
| Σχήμα 32: | Χρωμοσώματα μετάφασης στα οποία διακρίνεται ο μονόκλωνος G-κλώνος των τελομερών, κατόπιν σήμανσης με ειδικό PNA ανιχνευτή..... | 87 |
| Σχήμα 33: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή..... | 88 |
| Σχήμα 34: | Επιβεβαίωση της δράσης εξωνουκλεάσης της EXD2 στα τελομερή.... | 89 |
| Σχήμα 35: | Πυρήνες στους οποίους διακρίνονται οι συνεντοπισμοί RPA1/2 και τελομερικού DNA. | |
| Σχήμα 36: | Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η πλήρης αποσιώπηση της EXD2 αυξάνει τα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA στα ALT κύτταρα..... | 90 |
| Σχήμα 37: | Πυρήνες στους οποίους διακρίνονται τα αυξημένα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA..... | 90 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Σχήμα 38: | Γράφημα στο οποίο διακρίνεται ότι η υπερέκφραση της EXD2 καταστέλλει τον κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό c-HR στα τελομερή ALT κυττάρων..... | 92 |
| Σχήμα 39: | Ενδεικτική φωτογραφία U2OS EXD2 GFP κυττάρων, έπειτα από πείραμα CO-FISH..... | 92 |
| Σχήμα 40: | Η EXD2 καταστέλλει τον κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό c-HR στο γονιδίωμα των ALT κυττάρων..... | 93 |
| Σχήμα 41: | Χαρακτηριστική εικόνα γενωμικών SCEs | 94 |
| Σχήμα 42: | Γράφημα στο οποίο διακρίνεται ότι η απουσία της EXD2 αυξάνει τον αριθμό των ακάλυπτων τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων (telomere free ends)..... | 95 |
| Σχήμα 43: | Ενδεικτική φωτογραφία U2OS EXD2 KO κυττάρων στην οποία διακρίνονται τα ακάλυπτα τελομερικά άκρα των χρωμοσωμάτων (telomere free ends)..... | 96 |
| Σχήμα 44: | Dotplot στο οποίο φαίνεται ότι η πλήρης αποσιώπηση της EXD2 ελαττώνει το μήκος των τελομερών στα κύτταρα ALT..... | 97 |
| Σχήμα 45: | Γράφημα στο οποίο διακρίνεται ότι η EXD2 προστατεύει από τις προκαλούμενες από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2 ^{ΔM/ΔB} του TRF2- συντήξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων στα ALT κύτταρα..... | 98 |
| Σχήμα 46: | Ενδεικτική φωτογραφία U2OS WT κυττάρων στην οποία διακρίνεται χαρακτηριστική χρωμοσωμική σύντηξη, προκληθείσα από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2 ^{ΔM/ΔB} του TRF2..... | 99 |
| Σχήμα 47: | Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για τους τελομερικούς εκκινητές..... | 100 |
| Σχήμα 48: | Καμπύλες τήξεως RT-PCR για τους τελομερικούς εκκινητές..... | 100 |
| Σχήμα 49: | Γράφημα στο οποίο φαίνεται ότι η EXD2 καταστέλλει τη βιογένεση των C-Circles..... | 101 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1: Πληροφορίες πλασμιδίων και διαδικασιών που συμπεριλαμβάνονται στην παραγωγή τους..... | 67 |
| Πίνακας 2: Πληροφορίες πλασμιδίων και φορέων για την παραγωγή lenti-ιού.... | 69 |

Εισαγωγή

1.1 Δομή και λειτουργία γονιδιώματος

Η βασική λειτουργία του πυρηνικού γονιδιώματος αφορά στην αποθήκευση και μεταφορά της γενετικής πληροφορίας, η οποία στο πρώτο στάδιο εκφράζεται ως RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται στις πρωτεΐνες (Alberts *et al.*, 2002). Για την επιτυχή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ρυθμιστικών στοιχείων στο γονιδίωμα, έτσι ώστε αυτό να μεταβιβαστεί και να διαχωριστεί μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων. Λόγω του μεγέθους του DNA, είναι απαραίτητη η συμπύκνωση αυτού εντός του πυρήνα για την επιτυχή συμπύκνωση, μεταγραφή και αντιγραφή του γονιδιώματος, το DNA αλληλεπιδρά με ένα ειδικό σύνολο δομικών πρωτεϊνών που σχηματίζουν ένα ειδικό νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται **χρωματίνη**. Βασική δομική και λειτουργική μονάδα της χρωματίνης αποτελεί το νουκλεόσωμα, το οποίο συγκροτείται από το οκταμερές των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4, γύρω από το οποίο περιελίσσονται περίπου 147 ζεύγη βάσεων του DNA (van Holde, 1989; Alberts *et al.*, 2002). Η ικανότητα της χρωματίνης προς συμπύκνωση ρυθμίζεται κατά ένα μέρος από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των N-αμινοτελικών άκρων των ιστονών, συμπεριλαμβανομένων της ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, μεθυλίωσης και ουβικιτινυλίωσης. Για τους παραπάνω λόγους, η δομή της χρωματίνης χαρακτηρίζεται στο σύνολό της από το βαθμό της συμπύκνωσής της, την εκάστοτε θέση εντός της ευρύτερης αρχιτεκτονικής του πυρήνα, και των τροποποιήσεων των ιστονών. Το τελευταίο και ισχυρότερο επίπεδο συμπύκνωσης του DNA εμφανίζεται στο **μιτωτικό χρωμόσωμα**, στο οποίο ο βαθμός συμπύκνωσης είναι 1:10,000 (van Holde, 1989).

Το χρωμόσωμα λειτουργεί ως ανεξάρτητη λειτουργική μονάδα κάθε χρωμόσωμα πρέπει να δύναται να αντιγραφεί με ακρίβεια προκειμένου τα δύο αντίγραφα να διαχωριστούν και κατανεμηθούν στα δύο θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση. Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου, η οποία καταλαμβάνει περίπου το μισό χρόνο της συνολικής διάρκειας αυτού για ένα τυπικό κύτταρο θηλαστικού (Σχήμα 1) (Alberts *et al.*, 2002). Η διάρκεια αυτών των επιμέρους φάσεων του κυτταρικού κύκλου ποικίλλει σημαντικά στα διαφορετικά είδη κυττάρων. Για ένα τυπικό ταχέως πολλαπλασιαζόμενο ανθρώπινο κύτταρο με συνολική χρονική διάρκεια κυτταρικού κύκλου τις 24 ώρες, η φάση G₁

μπορεί να διαρκεί ~11 ώρες, η φάση S ~ 8 ώρες, η G₂ ~4 ώρες και η M ~1 ώρα (Cooper, 2000).

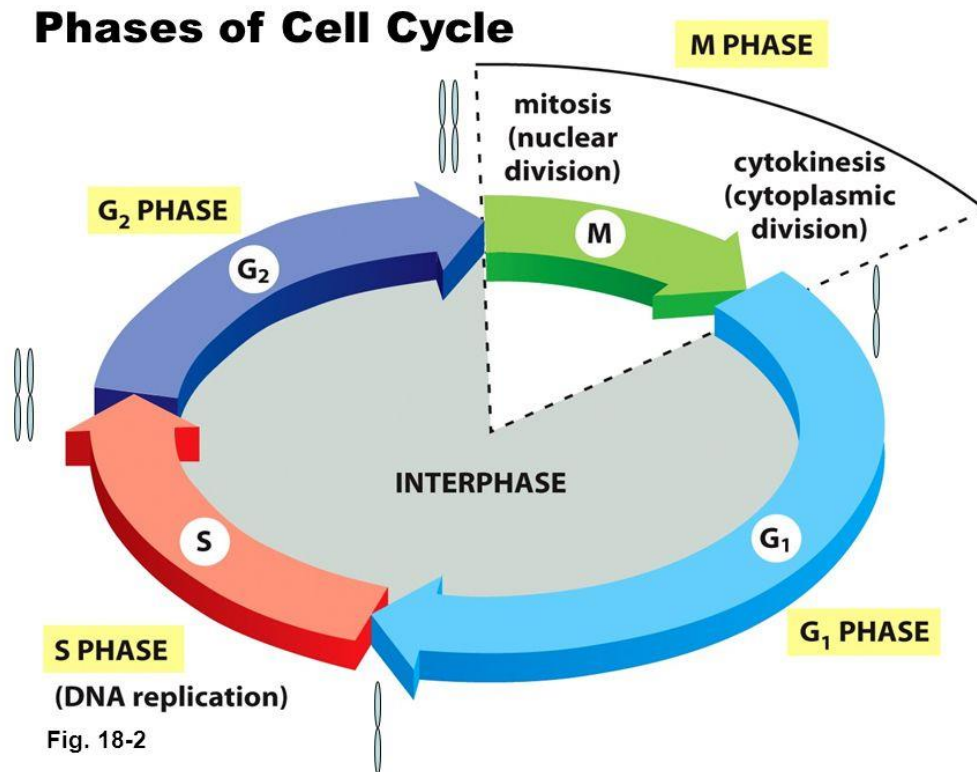


Fig. 18-2

Σχήμα 1: Ο κυτταρικός κύκλος. Το κύτταρο αναπτύσσεται συνεχώς στην μεσόφαση (interphase), η οποία αποτελείται από τρεις επιμέρους φάσεις τις G₁, S και G₂. Ο διπλασιασμός του DNA περιορίζεται στη φάση S. Η φάση G₁ είναι η ενδιάμεση φάση μεταξύ των φάσεων M και S, ενώ η G₂ είναι το αντίστοιχο διάστημα μεταξύ των φάσεων S και M. Κατά τη φάση M και την κυτταροκίνηση, ο πυρήνας και στη συνέχεια το κυτταρόπλασμα διαιρούνται (Alberts *et al.*, 2002).

Οι δύο ενδιάμεσες φάσεις G₁ και G₂ είναι περισσότερο απαραίτητες από απλές χρονικές καθυστερήσεις προκειμένου να επιτραπεί η κυτταρική ανάπτυξη· παρέχουν επίσης τον απαραίτητο χρόνο που χρειάζεται το κύτταρο για να παρακολουθεί το εσωτερικό και το εξωτερικό περιβάλλον προκειμένου να διασφαλίσει ότι οι συνθήκες είναι κατάλληλες, ενώ παράλληλα οι απαραίτητες ρυθμιστικές διαδικασίες έχουν ολοκληρωθεί προτού βρεθεί αντιμέτωπο με τη φάση S και τη μίτωση. Η φάση G₁ είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα παραπάνω. Η διάρκειά της μπορεί να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τις εξωτερικές συνθήκες και τα

εξωκυτταρικά σήματα που δέχεται το εκάστοτε κύτταρο. Εάν οι εξωκυτταρικές συνθήκες είναι δυσμενείς, τα κύτταρα δύνανται να καθυστερήσουν την ανάπτυξη τους κατά τη G_1 , ενώ υπάρχει και η επιλογή να εισέλθουν σε μια εξειδικευμένη κατάσταση ηρεμίας γνωστή ως φάση G_0 , στην οποία μπορούν να παραμείνουν για μέρες, εβδομάδες ή και χρόνια προτού επιτραπεί εκ νέου ο πολλαπλασιασμός τους (Alberts *et al.*, 2002).

Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της φάσης M του κυτταρικού κύκλου. Κάθε γραμμικό χρωμόσωμα αποτελείται από δύο **αδελφές χρωματίδες** (sister chromatids). Μετά το διπλασιασμό του DNA, οι αδελφές χρωματίδες συγκρατούνται ενωμένες διαμέσου μιας διαδικασίας που ονομάζεται sister-chromatid cohesion και αυτή η κατάσταση διατηρείται μέχρις ότου τα χρωμοσώματα αποχωριστούν. Η κυτταροκίνηση είναι το τελικό συμβάν στον κυτταρικό κύκλο, κατά τη διάρκεια του οποίου η κυτταρική μεμβράνη που περιβάλλει τους δύο πυρήνες συστέλλεται και τελικά διαχωρίζεται πλήρως σε δύο νέα θυγατρικά κύτταρα (Σχήμα 1) (Alberts *et al.*, 2002).

Η αντιγραφή του DNA και ο επιτυχής και ακριβής διαχωρισμός των δύο νέων αντιγράφων στα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση της ακεραιότητας του εκάστοτε κυττάρου και κατ'επέκταση ολόκληρου του οργανισμού. Αυτές οι βασικές λειτουργίες ελέγχονται από τρεις τύπους εξειδικευμένων αλληλουχιών νουκλεοτιδίων στο DNA, καθεμία από τις οποίες στρατολογεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες που, στη συνέχεια, καθοδηγούν τις πρωτεϊνικές μηχανές που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Αυτές οι ειδικές αλληλουχίες DNA δεν αποτελούν γονίδια, μπορεί ωστόσο να συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Αυτές είναι **τα σημεία έναρξης της αντιγραφής** (DNA replication origins), οι θέσεις από τις οποίες ξεκινά η αντιγραφή του DNA, **τα κεντρομερή**, τα οποία επιτρέπουν στο ένα αντίγραφο του εκάστοτε διπλασιασμένου και συμπυκνωμένου χρωμοσώματος να μεταφερθεί σε κάθε θυγατρικό κύτταρο, και **τα τελομερή**, τα άκρα εκάστοτε χρωμοσώματος τα οποία αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που επιτρέπουν την αποτελεσματική προστασία και αντιγραφή των άκρων των χρωμοσωμάτων (Alberts *et al.*, 2002).

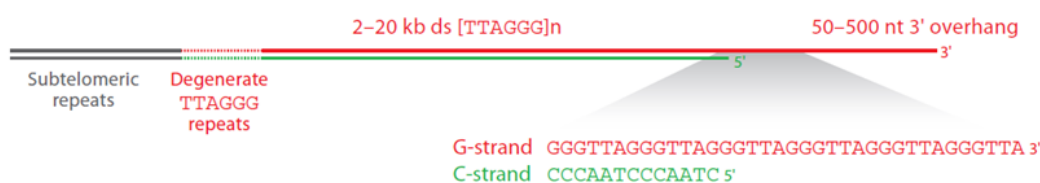
1.2. Τελομερή Θηλαστικών

1.2.1 Δομή τελομερών

Τα τελομερή των περισσότερων ευκαρυωτικών κυττάρων, από τα πρώτιστα έως και τα ανώτερα φυτά και θηλαστικά, αποτελούνται από δίκλωνες σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Palm and de Lange, 2008), τα οποία αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1930, αρχικά στη *Drosophila melanogaster* από τον Hermann Muller (Muller, 1938), και έπειτα στο καλαμπόκι, *Zea mays*, από την Barbara McClintock (McClintock, 1941). Συγκεκριμένα, ο Müller πρότεινε ότι τα άκρα των χρωμοσωμάτων αποτελούν ξεχωριστές δομές από το υπόλοιπο χρωμόσωμα και τα ονόμασε «telomeres», συνένωση των λέξεων *telo* = άκρο και *mere* = μέρος, και θεώρησε ότι αυτές οι δομές είναι απαραίτητες για τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων καθώς δεν ήταν σε θέση να δημιουργήσει ένα χρωμόσωμα που στερείται αυτών των δομών, κατόπιν κονιοποίησης χρωμοσωμάτων με τη χρήση ακτίνων Χ (Muller, 1938). Η McClintock κατέληξε στο συμπέρασμα ότι μία από τις βασικές λειτουργίες των τελομερών είναι η προστασία των άκρων των χρωμοσωμάτων από τη σύντηξη τόσο μεταξύ τους, όσο και με διπλόκλωνες θραύσεις του DNA (Zakian, 2012). Αργότερα, η Elizabeth Blackburn, μεταδιδακτορικός συνεργάτης στο εργαστήριο του Joseph Gall, αλληλούχισε και ανέλυσε τα άκρα μακροπυρηνικών ριβοσωμικών DNA μορίων στην *Tetrahymena thermophila* και διαπίστωσε ότι αποτελούνται από έναν μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων 5'-TTGGGG-3', οι οποίες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, περίπου 50 επαναλήψεις ανά DNA άκρο, με τον ακριβή αριθμό να ποικίλλει από μόριο σε μόριο (Blackburn and Gall, 1978).

Είναι πλέον γνωστό ότι στα θηλαστικά, όπως και στην πλειονότητα των ευκαρυωτικών, τα άκρα των χρωμοσωμάτων τους αποτελούνται από επαλαναμβανόμενες αλληλουχίες 5'-TTAGGG-3'. Ωστόσο, η δίκλωνη τελομερική αλληλουχία τερματίζεται σε μία σχετικά βραχεία, μονόκλωνη, πλούσια σε TTAGGG αλληλουχία που προεξέχει από το 3'-άκρο κάθε γραμμικού μορίου DNA (3'-overhang). Το μήκος της 3'-προεξοχής κυμαίνεται μεταξύ 30 και 600 νουκλεοτιδίων,

χαρακτηριστικό που διατηρείται σε όλο το ευκαρυωτικό βασίλειο (Kroustallaki and Gagos, 2015). Η 3'-προεξοχή των τελομερών στα θηλαστικά κυμαίνεται μεταξύ 50-500 νουκλεοτιδίων, η οποία είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την προεξοχή της πλειοψηφίας των άλλων ευκαρυωτικών (Σχήμα 2) (Palm and de Lange, 2008). Το μήκος των τελομερών επίσης ποικίλει μεταξύ των διαφόρων θηλαστικών. Για παράδειγμα, το μήκος των τελομερών του ανθρώπου είναι τυπικά 10-15 kb κατά τη γέννηση (Blackburn and Gall, 1978), ενώ το αντίστοιχο μήκος τελομερών των εργαστηριακών ποντικών και αρουραίων κυμαίνεται μεταξύ 20-50 kb (Palm and de Lange, 2008).



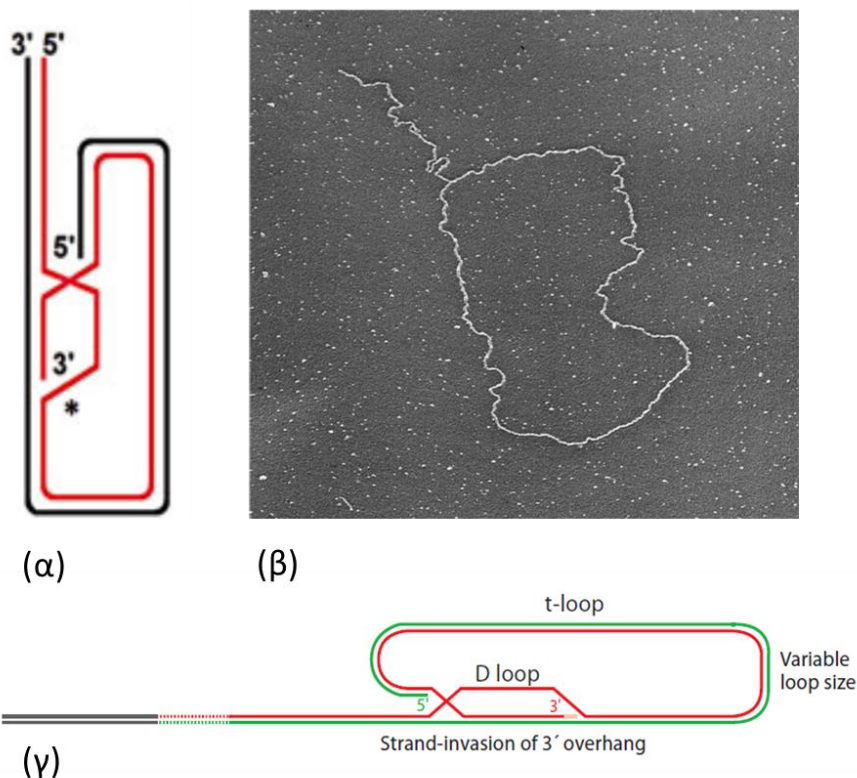
Σχήμα 2: Η δομή των τελομερών του ανθρώπου. Τα χρωμοσώματα του ανθρώπου τερματίζονται με σειρά επαναλήψεων 5'-TTAGGG-3' οι οποίες ποικίλλουν σε μήκος. Εγγύς στις τελομερικές επαναλήψεις βρίσκεται ένα τμήμα εκφυλισμένων επαναλήψεων και υποτελομερειακών επαναλαμβανόμενων στοιχείων. Το άκρο του τελομερούς αποτελείται από μια προεξοχή του G-κλώνου. Το 3'-άκρο δεν ορίζεται με ακρίβεια, σε αντίθεση με το 5'-άκρο των το οποίο σχεδόν πάντα χαρακτηρίζεται από την αλληλουχία ATC-5' (Palm and de Lange, 2008).

1.2.2 Η t-θηλιά, t-loop

Από την απαρχή της ζωής, το κυκλικό προκαρυωτικό γονιδίωμα των αρχέγονων κυττάρων ανέπτυξε ένα σύνθετο και πολύπλοκο βιολογικό μηχανισμό με στόχο τη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA προκειμένου να εξασφαλίσει την κυτταρική ομοιόσταση και την πιστότητα της μετάδοσης των ακριβών γενετικών πληροφοριών διαμέσω ολόκληρων γενεών κυττάρων. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το αρχέγονο κυκλικό γονιδίωμα εξελίχθηκε σε πολλαπλές γραμμικές χρωμοσωμικές οντότητες οι οποίες σε πολλά είδη δύνανται να παρατηρηθούν με

φωτονικό μικροσκόπιο σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα κατόπιν πυρηνόφιλης χρώσης (Kroustallaki and Gagos, 2015).

Με χρήση τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατηρήθηκε ότι τα τελομερή των ποντικών, καθώς και των ανθρώπων είναι οργανωμένα ώστε να σχηματίζεται μια ειδική δομή ενός δίκλωνου βρόγχου, γνωστή ως t-θηλειά ή t-loop (Σχήμα 3β) (Griffith *et al.*, 1999). Οι t-loops σχηματίζονται κατά την εισβολή της 3'-προεξοχής στη δίκλωνη περιοχή του τελομερούς (Σχήμα 3γ). Συγκεκριμένα, η 3'-προεξοχή σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων με τον πλούσιο σε C νουκλεοτίδια κλώνο, μετατοπίζοντας τον πλούσιο σε G νουκλεοτίδια κλώνο σε αυτή τη θέση προς σχηματισμό του βρόγχου μετατόπισης, D-loop (Palm and de Lange, 2008).



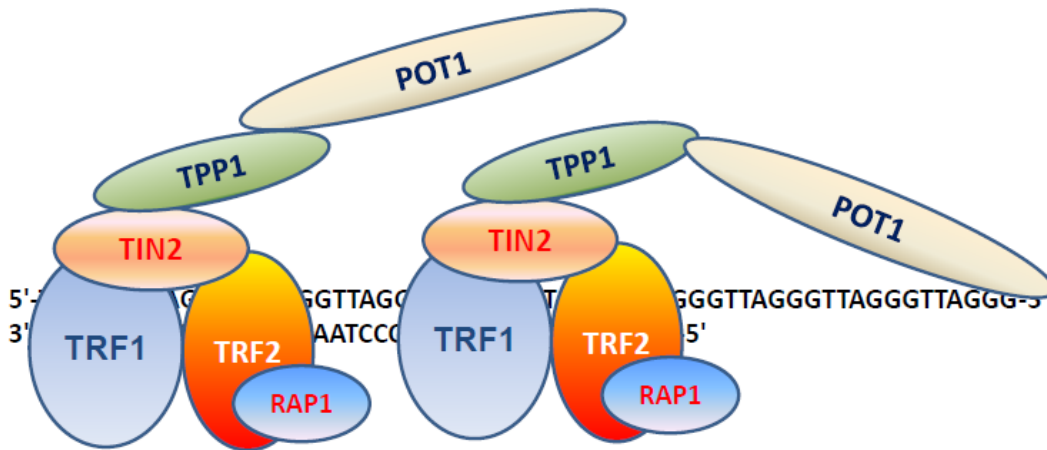
Σχήμα 3: Διαφορετικές αναπαραστάσεις της t-θηλειάς. (α) Σχηματική άποψη της δομής της t-θηλειάς προς σύγκριση με το (β) (Kroustallaki and Gagos, 2015). (β) Δομή της t-θηλειάς, όπως αυτή παρατηρήθηκε με τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τελομερικό DNA από τον κλώνο 1.2.11 κυττάρων HeLa απομονώθηκε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού κατόπιν επεξεργασίας με ψωραλένιο/υπεριώδη ακτινοβολία στους πυρήνες των κυττάρων, αποπρωτεϊνοποίηση και πέψη με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Ακολούθησε περιστροφική σκίαση (shadowcasting) με κράμα

πλατίνας-παλλαδίου. Αρνητική σκίαση (Griffith *et al.*, 1999). (γ) Σχηματική άποψη της δομής t-loop στην οποία υποδεικνύονται οι D- και t-loop. Το μέγεθος του βρόχου είναι μεταβλητό (Palm and de Lange, 2008).

Έχει προταθεί ότι οι t-loops παρέχουν μια αρχιτεκτονική λύση στο πρόβλημα της προστασίας των τελομερών, καλύπτοντας και, κατ'επέκταση, αποκρύπτοντας τα άκρα των τελομερών από τις μηχανές επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Ακόμη και σήμερα, λίγα είναι γνωστά για τη δυναμική της t-loop και τον τρόπο με τον οποίο ο σχηματισμός της κινητοποιείται από τις τελομερικές πρωτεΐνες. Επίσης, δεν είναι σαφές κατά πόσον οι t-loops παραμένουν ανέπαφες κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή αν απαιτούν παρατεταμένη αποσύνθεση (resolution) κατά την αντιγραφή του DNA (Palm and de Lange, 2008).

1.2.3 Το σύμπλοκο της σελτερίνης

Οι τελομερικές επαναλήψεις TTAGGG των άκρων των χρωμοσωμάτων στα θηλαστικά βρίσκονται σε αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο έξι πρωτεϊνών, σελτερίνη (Σχήμα 4). Το σύμπλοκο αυτό επιτρέπει στα κύτταρα να διακρίνουν τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων από περιοχές θραύσεων του DNA, καταστέλλοντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των μηχανισμών επιμήκυνσης των τελομερών (Palm and de Lange, 2008). Οι πρωτεΐνες που αποτελούν το σύμπλοκο της σελτερίνης και εντοπίζονται ειδικά στα τελομερή καθ'όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι οι πρωτεΐνες TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2, και RAP1 (Kroustallaki and Gagos, 2015).



Σχήμα 4: Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο της σελητερίνης. Οι TRF1 και TRF2 προσδένονται στο δίκλωνο τμήμα των τελομερών, ενώ η POT1 αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στο μονόκλωνο τμήμα του τελομερούς. Οι TIN2 και TPP1 είναι οι πρωτεΐνες που συγκρατούν τις υπόλοιπες στο σύμπλοκο της σελητερίνης ως «γεφυρωτικές πρωτεΐνες», ενώ η RAP1 συνδέεται με την TRF2 (Kroustallaki and Gagos, 2015).

Η ειδικότητα του συμπλόκου της σελητερίνης για τα τελομερή οφείλεται στην αναγνώριση των επαναλήψεων TTAGGG διαμέσου τριών από τις πρωτεΐνες που το αποτελούν. Αυτές είναι οι πρωτεΐνες TRF1, TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1/2) και POT1 (Protection Of Telomeres 1). Οι TRF1 και TRF2 προσδένονται στο δίκλωνο τμήμα των τελομερών, ενώ η POT1 αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στο μονόκλωνο τμήμα του τελομερούς, μέσω των TTAGGG αλληλουχιών της 3'-προεξοχής και της D-loop. Οι TRF1 και TRF2 στρατολογούν και τα υπόλοιπα τέσσερα συστατικά του συμπλόκου της σελητερίνης: TIN2 (TRF2- and TRF1-Interacting Nuclear protein 2), TPP1 [εναλλακτικά TINT1, PTOP, ή PIP1 (Rajavel, Mullins and Taylor, 2014)], RAP1 (ορθόλογη της πρωτεΐνης Repressor/Activator Protein 1 στο ζυμομύκητα) και την ίδια την POT1 (Kroustallaki and Gagos, 2015). Οι TIN2 και TPP1 είναι οι πρωτεΐνες που συγκρατούν τις υπόλοιπες στο σύμπλοκο της σελητερίνης, λειτουργώντας ως «γεφυρωτικές» πρωτεΐνες (O'Connor *et al.*, 2006; Palm and de Lange, 2008). Συγκεκριμένα, η TPP1 προσδένει την POT1 σχηματίζοντας ετεροδιμερές (O'Connor *et al.*, 2006; Rajavel, Mullins and Taylor, 2014), η RAP1 αλληλεπιδρά με την TRF2

(O'Connor *et al.*, 2004), ενώ η TIN2 μέσω της αλληλεπίδρασής της με την TRF1, συνδέει τις TRF1 και TRF2 στο ετεροδιμερές TPP1/POT1 (O'Connor *et al.*, 2006).

Οι TRF1 και TRF2 προσδένονται στο DNA ως ομοδιμερή ή ολιγομερή που σχηματίζονται μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων των λειτουργικών περιοχών TRFH (Bianchi *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1997), ενώ παράλληλα δεν αλληλεπιδρούν άμεσα (Broccoli *et al.*, 1997; Fairall *et al.*, 2001). Ο πολυμερικός τρόπος πρόσδεσης των TRF1 και TRF2 αυξάνει τη συγγένεια πρόσδεσής τους με το DNA και ταυτόχρονα ενισχύει την ικανότητά τους δρουν ως παράγοντες τροποποίησης της αρχιτεκτονικής του DNA (Palm and de Lange, 2008). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη TRF2 προσδένεται κατά προτίμηση στο τέλος μίας συστοιχίας επαναλήψεων TTAGGG εάν αυτές περιέχουν μια προεξοχή του G-κλώνου μήκους τουλάχιστον 6 νουκλεοτιδίων. Ο πολυμερικός τρόπος πρόσδεσης της TRF2 επιπλέον επάγει το σχηματισμό θετικών υπερελικώσεων (supercoils) που προωθούν την αποπεριέλιξη/ξετύλιγμα και την εισβολή του μονόκλωνου κλώνου στο δίκλωνο τελομερικό DNA. Μέσω μιας διαφορετικής λειτουργικής περιοχής, της GAR, η TRF2 διαθέτει αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης για ειδικές δομές του DNA, συμπεριλαμβανομένων των χιασμάτων Holliday (Holliday junctions, βλ. κεφάλαιο Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA) (Palm and de Lange, 2008).

Τα επιμέρους τμήματα της σελτερίνης αλληλεπιδρούν με πληθώρα πρωτεϊνών των μηχανισμών απόκρισης στις βλάβες του DNA, DDR (DNA Damage Response) και επιδιόρθωσης των βλαβών αυτών, καθώς και πυρηνικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται είτε στον μεταβολισμό των τελομερών είτε στη διασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της μιτωτικής πιστότητας. Αρκετά από αυτά τα μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες ATM, ATR, TANK1, TANK2, ERCC1/XPF, DNA-PKs, BRCA1, BRCA2, PARP1 και PARP2, έχουν εμπλακεί σε σύνδρομα πρόωρης γήρανσης, κληρονομική προδιάθεση καρκίνου και σποραδικές νεοπλασίες (Palm and de Lange, 2008; Hoeijmakers, 2009).

1.3. Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA

Το γονιδίωμα υφίσταται διαρκώς βλάβες οι οποίες προέρχονται από ενδογενείς ή εξωγενείς πηγές. Οι ενδογενείς βλάβες δημιουργούνται κατά την

διάρκεια κυτταρικών διαδικασιών όπως είναι η αντιγραφή του DNA, καθώς και κατά την διάρκεια των μεταβολικών διεργασιών του κυττάρου, κατά τις οποίες παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Jackson and Bartek, 2009). Οι εξωγενείς βλάβες προέρχονται από τη δράση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η υπεριώδης και η ιοντίζουσα ακτινοβολία, οι τοξίνες και άλλα χημικά, η θερμική διάσπαση ουσιών, και πληθώρα μεταλλαξογόνων παραγόντων (Jackson and Bartek, 2009). Οι βλάβες αυτές είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν τα διμερή θυμιδινών, αλλοιώσεις βάσεων, π.χ. απαμίνωση και αποπουρίνωση (Nakamura and Swenberg, 1999), μονόκλωνες και διπλόκλωνες θραύσεις στο DNA, κ.ά. (Lindahl, 1993; Hoeijmakers, 2009). Η πιο επιβλαβής μορφή βλάβης του DNA είναι οι θραύσεις διπλής έλικας ή διπλόκλωνες θραύσεις, DSB (Double Strand Breaks, DSBs), των οποίων η επιδιόρθωση είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Οι DSB επιδιορθώνονται κυρίως από δύο κατηγορίες μηχανισμών, τον ομόλογο ανασυνδυασμό, HR (Homologous Recombination), και τον μηχανισμό μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, NHEJ (Non-Homologous End Joining) (Jackson and Bartek, 2009; Jasin and Haber, 2016).

1.3.1. Μη ομόλογη σύνδεση των άκρων, NHEJ

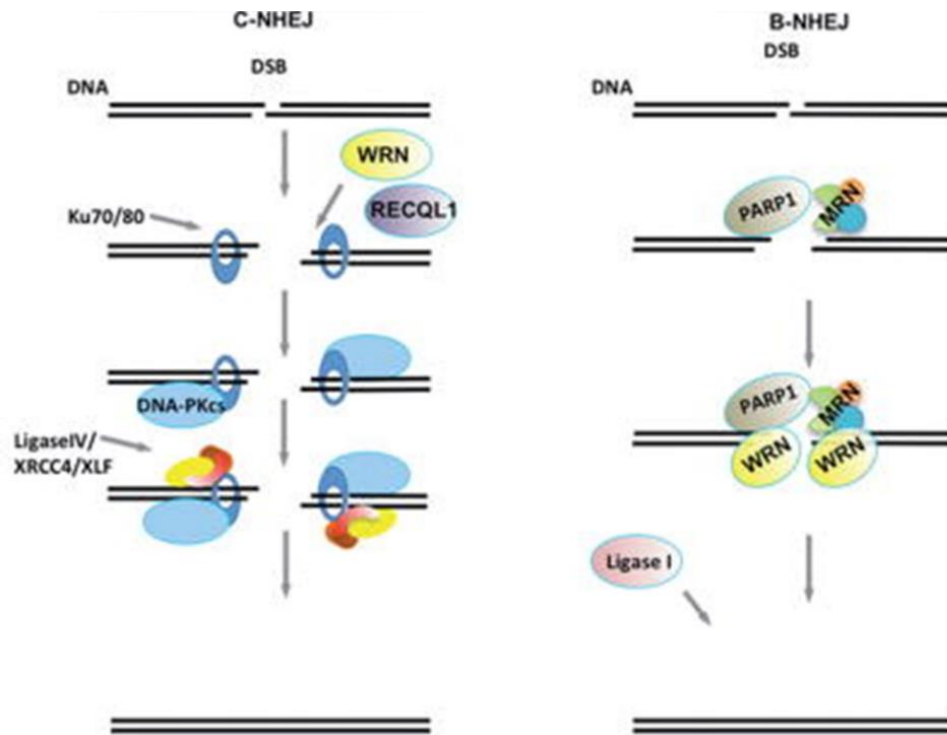
1.3.1.1. Κανονικός μηχανισμός μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, c-NHEJ

Ο κανονικός μηχανισμός μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, ο οποίος όπως αποκαλύπτει και το όνομά του δεν εξαρτάται από την ύπαρξη ομολογίας αλληλουχιών, αποτελεί τον κύριο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA κατά τη διάρκεια των φάσεων G_0/G_1 του κυτταρικού κύκλου, ωστόσο λειτουργεί καθ'όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Chiruvella, Liang and Wilson, 2013). Κατά τη διάρκεια του c-NHEJ, από τη στιγμή που σχηματίζεται μία DSB, τα άκρα που την πλαισιώνουν δεσμεύονται από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου Ku70/80 (ku70 και ku80), οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερές και προστατεύουν τα άκρα από τη νουκλεολυτική αποικοδόμηση (Σχήμα 5) (Ma *et al.*, 2005; Kass and Jasin, 2010). Οι πρωτεΐνες Ku προάγουν την άμεση σύνδεση των σπασμένων άκρων του DNA (Ma *et al.*, 2005) με στρατολόγηση του εξειδικευμένου συμπλόκου DNA-PKs και έπειτα του

συμπλόκου λιγασών LigIV/XRCC4/XLF (Keijzers *et al.*, 2014). Το σύμπλοκο καταλύει την σύνδεση των «τυφλών» άκρων του DNA, δηλαδή τις ελεύθερες 3'-OH και 5'-φωσφορικές ομάδες. Εάν τα σπασμένα άκρα του DNA δεν είναι τυφλά/ελεύθερα, όπως παραπάνω, απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία παρουσία ειδικών νουκλεασών και πολυμερασών προκειμένου να επανασυνδεθούν (Ma *et al.*, 2005). Ωστόσο, κατά την επεξεργασία αυτή, η εισαγωγή μικρού μήκους απαλοιφών και εισαγωγών αποτελεί συχνό φαινόμενο. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο ο NHEJ θεωρείται μηχανισμός ιδιαίτερα επιρρεπής σε σφάλματα (Symington and Gautier, 2011). Ωστόσο, παρά την μεταλλαξιγένεση που σχετίζεται με τον NHEJ, η ταχεία κινητική του επιτελεί σημαντικό ρόλο στη διασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος (Difilippantonio *et al.*, 2000).

1.3.1.2. Εναλλακτικός μηχανισμός μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, alt-NHEJ/b-NHEJ

Η αναφορά στον μηχανισμό NHEJ αφορά την απευθείας συνένωση δύο άκρων της DSB, η οποία δημιουργεί περιοχές σύνδεσης με καθόλου ή ελάχιστη ομολογία (<10 bp) (Hefferin and Tomkinson, 2005). Αυτή η μορφή του NHEJ αναφέρεται ως κανονική μορφή του NHEJ, c-NHEJ (canonical-NHEJ). Ωστόσο, υπάρχει μία ακόμη μορφή του μηχανισμού αυτού, η οποία αναφέρεται ως εναλλακτικός-NHEJ, alt-NHEJ (alternative-NHEJ) (Decottignies, 2013), επίσης γνωστός ως b-NHEJ (Σχήμα 5) (Keijzers *et al.*, 2014). Έχει προταθεί ότι ο b-NHEJ είναι περισσότερο επιρρεπής σε σφάλματα από τον c-NHEJ επειδή χαρακτηρίζεται από πιο αργή κινητική στην επιδιόρθωση του DNA (Durante *et al.*, 2013). Τα ένζυμα που συμμετέχουν στον b-NHEJ περιλαμβάνουν την MRE11 του συμπλόκου MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), τις PARP1, WRN, LigaseI και την DNA πολυμεράση θ (Polθ) (Keijzers *et al.*, 2014).



Σχήμα 5: Οι μηχανισμοί c-NHEJ και b-NHEJ. (α) Κατά τον c-NHEJ, τα άκρα που πλαισιώνουν την DSB δεσμεύονται από το σύμπλοκο Ku70/80, του οποίου οι πρωτεΐνες σχηματίζουν ετεροδιμερές και προστατεύουν τα άκρα του DNA από τη νουκλεολυτική αποικοδόμηση. Κατόπιν, οι πρωτεΐνες Ku στρατολογούν το εξειδικευμένο σύμπλοκο DNA-PKs και εν συνεχεία το σύμπλοκο λιγασών LigIV/XRCC4/XLF (Keijzers et al., 2014). Το τελευταίο σύμπλοκο καταλύει την σύνδεση των τυφλών άκρων του DNA. (β) Με παρόμοιο τρόπο λειτουργεί και ο μηχανισμός b-NHEJ. Ωστόσο, στον b-NHEJ απαιτείται ελάχιστη νουκλεολυτική επεξεργασία των άκρων, ενώ τα ένζυμα που συμμετέχουν στον b-NHEJ περιλαμβάνουν την MRE11 του συμπλόκου MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), τις PARP1, WRN, LigaseI και την Polθ, ενώ όχι τις Ku70/80 και DNA-PKs (Keijzers et al., 2014).

1.3.1.3. Εναλλακτικός μηχανισμός σύνδεσης των άκρων, alt-NHEJ/MMEJ

Υπάρχει και τρίτη κατηγορία εναλλακτικής σύνδεσης των άκρων, το μονοπάτι επιδιόρθωσης διαμεσολαβούμενης από μικροομολογία DNA σύνδεσης των άκρων, MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining), που θα αναλυθεί στο υποκεφάλαιο 1.3.2.4., και το οποίο εμφανίζει δύο αποκλίνοντα χαρακτηριστικά από τον c-NHEJ. Πρώτον, η εμπλοκή των αλληλουχιών που εμφανίζουν μικροομολογία 5-25 ζευγών βάσεων κατά τη διάρκεια της ευθυγράμμισης των σπασμένων άκρων πριν την σύνδεσή τους, και δεύτερον η βραδύτερη κινητική της επιδιόρθωσης (Difilippantonio

et al., 2000). Όπως ο c-NHEJ, ο MMEJ συσχετίζεται με ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων όπως απαλοιφές, μετατοπίσεις, αναστροφές και άλλες πολύπλοκες δομικές αναδιατάξεις (Bhattacharjee and Nandi, 2016).

1.3.2. Όμόλογος ανασυνδυασμός, HR

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός αποτελεί τον πιστότερο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA, αφού αποφεύγονται τυχόν λάθη, λόγω της υψηλής ομολογίας μεταξύ των αλληλουχιών που εμπλέκονται. Ο HR αποτελεί το κύριο μονοπάτι αποκατάστασης διπλόκλωνων βλαβών κατά τις φάσεις S και G₂ του κυτταρικού κύκλου, όπου η αντιγραφή του DNA είναι μέγιστη και ολοκληρωμένη, αντίστοιχα, και ως εκ τούτου, είναι διαθέσιμη η μία εκ των δύο αδελφών χρωματίδων ως μήτρα ομολογίας (Bhattacharjee and Nandi, 2016).

Τρία είναι τα βασικά στάδια κατά τον HR: το προσυναπτικό στάδιο, η σύναψη και το μετασυναπτικό στάδιο. Μηχανιστικά, κατά το προσυναπτικό στάδιο, η DSB υφίσταται νουκλεολυτική επεξεργασία προς δημιουργία ssDNA (μονόκλωνων τμημάτων DNA) ουρών με 3'-άκρα, μέσω νουκλεασών (Paull and Gellert, 1998), όπως το σύμπλοκο MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)/CtIP (Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Το ssDNA στη συνέχεια καλύπτεται με την Πρωτεΐνη A της Αντιγραφής, RPA (Replication Protein A), προκειμένου να το προστατεύσει από τη δράση νουκλεασών και να διαμεσολαβήσει τα επόμενα στάδια του HR (San Filippo, Sung and Klein, 2008). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πρωτεϊνών διαμεσολαβητών όπως οι Rad52, Rad55-57 και άλλων, η Rad51 εκτοπίζει την RPA και προσδέεται στο ssDNA σχηματίζοντας «νουκλεοπρωτεϊνικό νήμα» (Sugiyama and Kowalczykowski, 2002; San Filippo, Sung and Klein, 2008). Το επικαλυμμένο με Rad51 νήμα νουκλεοπρωτεϊνης καταλύει την εισβολή του ssDNA κλώνου εντός μιας δίκλωνης ομόλογης περιοχής προς σχηματισμό μιας ενδιάμεσης δομής που αναφέρεται ως βρόχος μετατόπισης, D-loop, και μετά την οποία εισβολή το εισερχόμενο 3'-άκρο εκκινεί τη νεοσύνθεση του DNA (Paull and Gellert, 1998; Bhattacharjee and Nandi, 2016). Ο σχηματισμός του ενδιάμεσου χιάσματος των DNA τμημάτων (intermediate junction) αποτελεί το στάδιο της σύναψης. Κατά τη διάρκεια της μετασύναψης, τα ενδιάμεσα των διασταυρώσεων υπόκεινται σε επεξεργασία προς σχηματισμό ώριμων

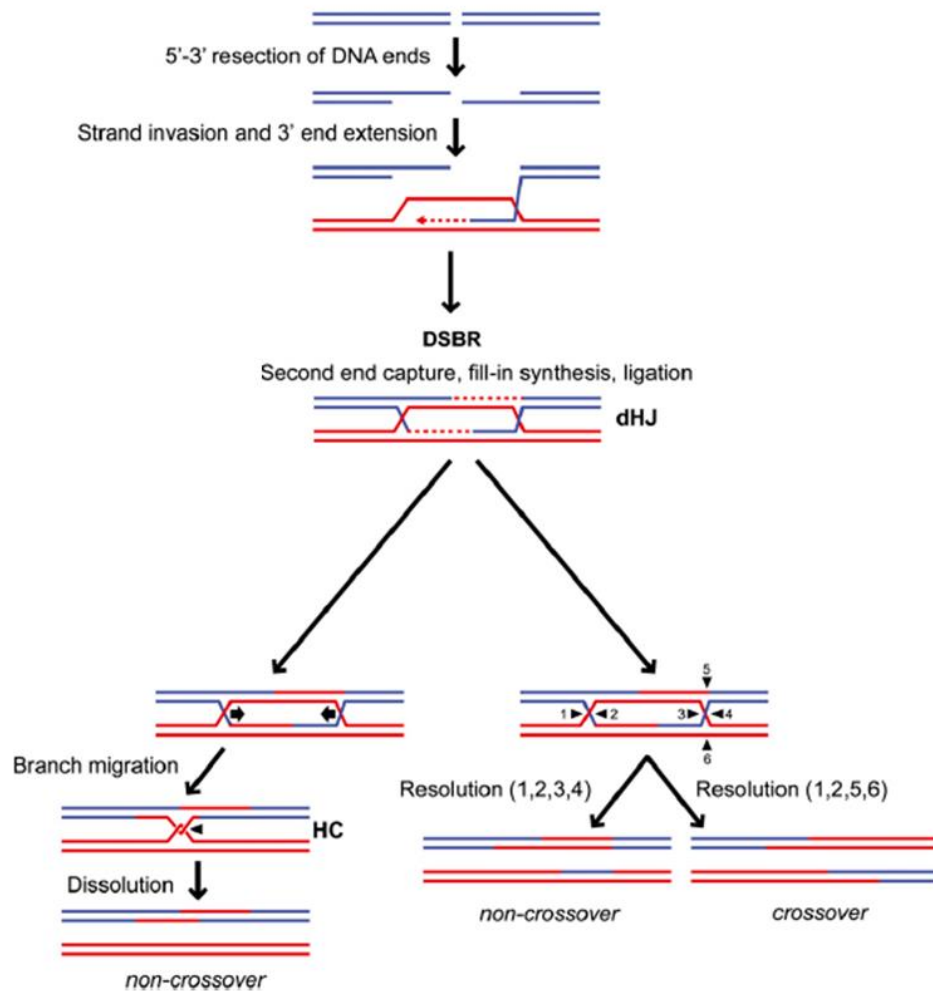
ανασυνδυσμένων προϊόντων (Hunter and Kleckner, 2001). Ο τελικός τρόπος επεξεργασίας των ενδιάμεσων προϊόντων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση της αρχικής θραύσης και τις επικρατούσες κυτταρικές συνθήκες, όπως οι τοπικές συγκεντρώσεις των εκάστοτε πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επεξεργασία (Bhattacharjee and Nandi, 2016).

Παρά τις γενικές αρχές που διέπουν τον κλασικό HR, σήμερα είναι γνωστές έξι υποκατηγορίες του HR, κάθε μία από τις οποίες διαθέτει τα δικά της επιπρόσθετα χαρακτηριστικά. Αυτές οι υποκατηγορίες περιλαμβάνουν τους μηχανισμούς: (1) κανονικής οδού επιδιόρθωσης των διπλόκλωνων θραύσεων, DSBR (Double Strand Break Repair), (2) εξαρτώμενης από τη σύνθεση ανασύνδεσης κλώνου, SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing), (3) επαγόμενης από θραύση αντιγραφής, BIR (Break-Induced Replication), (4) ανασύνδεσης μονού κλώνου, SSA (Single-Strand Annealing), (5) εναλλακτικής σύνδεσης των άκρων/διαμεσολαβούμενης από μικροομολογία σύνδεσης των άκρων, alt-EJ/MMEJ (alternative-End Joining/Microhomology-Mediated End Joining), και (6) την DSBR με RNA υπόστρωμα/μήτρα (Bhattacharjee and Nandi, 2016).

1.3.2.1. Μηχανισμός επιδιόρθωσης DSB, DSBR

Το βασικότερο μονοπάτι επιδιόρθωσης των DSB του HR αποτελεί το μονοπάτι DSBR (Szostak *et al.*, 1983) (Σχήμα 6). Σύμφωνα με το μοντέλο που το περιγράφει, μόλις σχηματιστεί η DSB, ο ανασυνδυασμός εκκινείται στο σημείο της θραύσης (San Filippo, Sung and Klein, 2008). Για να γίνει αυτό, πραγματοποιείται νουκλεολυτική επεξεργασία των άκρων της DSB από νουκλεάσες, αποικοδομώντας τον κλώνο του 5'-άκρου προς σχηματισμό 3'-προεξοχής με ελεύθερο 3'-OH σε καθεμία από τις δύο πλευρές της DSB. Η μία εκ των δύο προεξοχών στη συνέχεια εισβάλλει σε ομόλογη δίκλωνη περιοχή DNA, δημιουργείται η D-loop, και εκκινείται η νεοσύνθεση του DNA με μήτρα την ομόλογη διαθέσιμη αλληλουχία. Η σύνθεση του DNA εκκινείται από το 3'-άκρο του εισερχόμενου κλώνου που έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση του βρόγχου D-loop, ο οποίος εκθέτει το DNA το οποίο είναι συμπληρωματικό προς την ουρά ssDNA στο άλλο άκρο της θραύσης. Αυτή η ουρά ανασυνδέεται με τη D-loop σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως δεύτερη σύλληψη άκρου (second end capture)

(Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Η ακόλουθη σύνδεση των 5'-άκρων των δύο αλυσίδων οδηγεί στη δημιουργία ενδιάμεσων δομών-χιασμάτων τεσσάρων κατευθύνσεων, τύπου Holliday (Holliday junctions) (Raji and Hartsuiker, 2006).



Σχήμα 6: Το μονοπάτι επιδιόρθωσης διπλόκλωνων θραύσεων DSBR. Κατόπιν αναγνώρισης της DSB, ακολουθεί νουκλεολυτική επεξεργασία των άκρων της από νουκλεάσες, αποικοδομώντας τον κλώνο του 5'-άκρου προς σχηματισμό 3'-προεξοχής σε κάθε κλώνο. Η μία εκ των δύο προεξοχών στη συνέχεια εισβάλλει σε ομόλογη δίκλωνη περιοχή DNA προς δημιουργία της D-loop, και εκκινείται η νεοσύνθεση του DNA με μήτρα την ομόλογη διαθέσιμη αλληλουχία. Μετά την ανασύνδεση του νεοσυντιθέμενου DNA στα 5'-άκρα, σχηματίζεται ένα διπλό ενδιάμεσο χίασμα τύπου Holliday, dHJ. Το dHJ μπορεί είτε να διαλυθεί μέσω μεταναστεύσεως του βρόγχου (σχηματισμός ημικανετανίου, HC), οδηγώντας σε προϊόντα χωρίς επιχιασμό, NCO, είτε να διαχωριστεί με ενδονουκλεολυτική διάσπαση προς παραγωγή προϊόντων χωρίς επιχιασμό NCO (θέσεις 1, 2, 3 και 4) ή με επιχιασμό, CO (θέσεις 1, 2, 5, και 6) (Symington, Rothstein and Lisby, 2014).

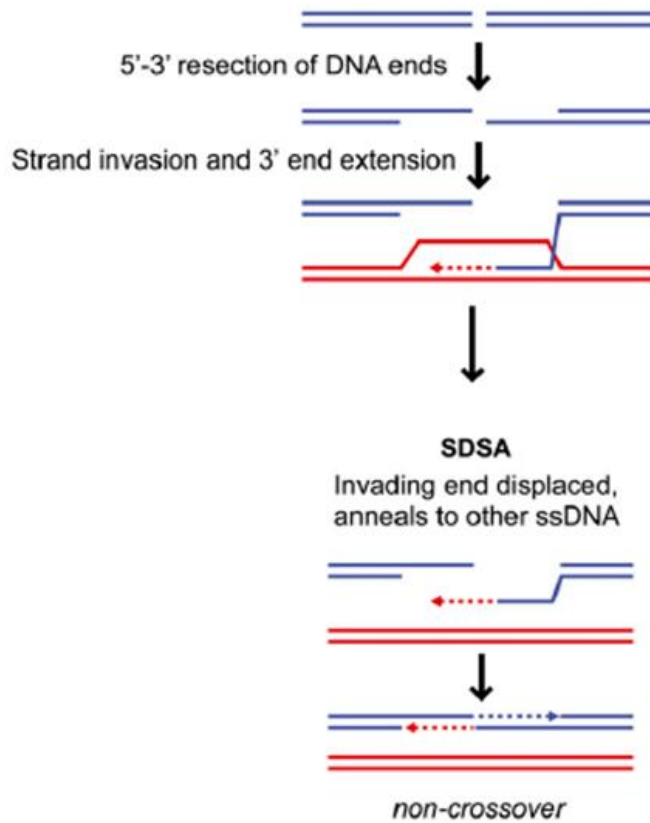
Για να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός των δύο HJs, επίσης αναφερόμενος ως ο διπλό χιάσμα Holliday (double-HJ), η δομή DNA των τεσσάρων κατευθύνσεων υφίσταται ενδονουκλεολυτική αποδόμηση ζεύγους συμμετρικά συγγενών DNA κλώνων σε κάθε χιάσμα (Raji and Hartsuiker, 2006). Αυτό καταστρέφει τη σύνδεση μεταξύ των δύο μορίων DNA που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αποκομμένων γραμμικών διπλόκλωνων ελίκων που στη συνέχεια συγκολλούνται από λιγάσες (Bhattacharjee and Nandi, 2016).

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του DSBR είναι ότι η επιλογή του κλώνου που αποδομείται σε κάθε χιάσμα Holliday καθορίζει τον τύπο του ανασυνδυασμένου μορίου DNA που δημιουργείται (Σχήμα 6) (Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Η απομάκρυνση των HJ επιτυγχάνεται είτε με τη δράση τοποϊσομερασών και ελικάσών (dissolution), ή τη δράση ενδονουκλεασών (resolution). Στην πρώτη περίπτωση προκύπτουν προϊόντα χωρίς επιχιασμό, NCO (non-crossover). Στην δεύτερη περίπτωση, κατά τη διάσπαση των εσωτερικών κλώνων και των δύο HJ, προκύπτουν προϊόντα χωρίς επιχιασμό, NCO (non-crossover), ενώ κατά την διάσπαση των εσωτερικών κλώνων του ενός HJ και των εξωτερικών του δεύτερου HJ, προκύπτουν προϊόντα με επιχιασμό (Hunter and Kleckner, 2001; Symington, Rothstein and Lisby, 2014; Bhattacharjee and Nandi, 2016).

1.3.2.2. Εξαρτώμενη από τη DNA σύνθεση ανασύνδεση κλώνου, SDSA

Όπως και στο μοντέλο της προηγούμενης παραγράφου, DSBR, ο ανασυνδυασμός στο μονοπάτι SDSA κινητοποιείται στις DSBs και το 3'-άκρο του εισβαλλόμενου κλώνου λειτουργεί ως εκκινήτης για τη νεοσύνθεση DNA (Σχήμα 7) (Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Ωστόσο, αντί του σχηματισμού dHJ, στο μονοπάτι SDSA σχηματίζεται ένας βραχύς βρόγχος D-loop, ο οποίος διαλύεται με τη βοήθεια ελικάσών προτού λάβει χώρα η δεύτερη σύλληψη άκρου (second end capture). Ο νεοσυντιθέμενος κλώνος στη συνέχεια ανασυνδέεται στο συμπληρωματικό άκρο της δεύτερης ουράς, οδηγώντας αποκλειστικά στην παραγωγή ανασυνδυασμένων προϊόντων χωρίς επιχιασμό, NCO (Sun *et al.*, 2008). Σε μιτωτικά κύτταρα ζύμης, δύο ελικάσες, οι Srs2 και Mph1, προάγουν το μονοπάτι SDSA και καταστέλλουν τον ανασυνδυασμό με επιχιασμό, CO (Sun *et al.*, 2008),

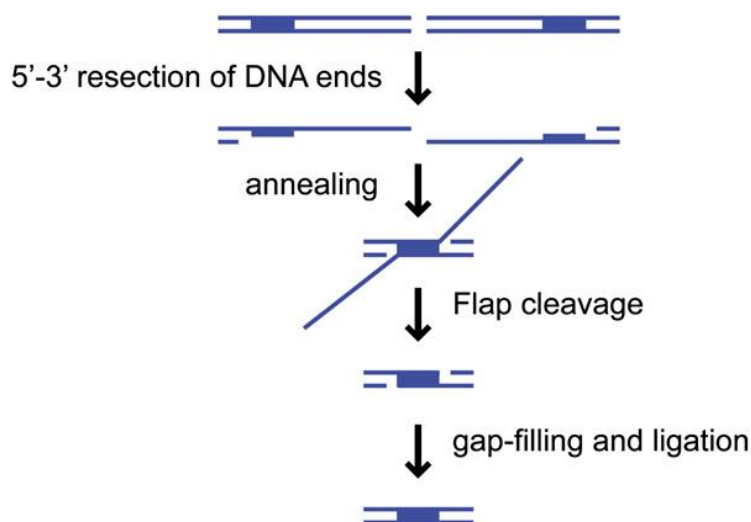
προσδένοντας αμφότερες την Rad51, επομένως διαταράσσοντας τα προσυναπτικά νουκλεοπρωτεϊνικά νημάτια Rad51, και κατ'έπείτα αποδομώντας τον βρόγχο D-loop (Krejci *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2009).



Σχήμα 7: Το μονοπάτι επιδιόρθωσης εξαρτώμενης από τη DNA σύνθεση ανασύνδεσης κλώνου, SDSA. Παρομοίως με το μονοπάτι επιδιόρθωσης διπλόκλωνων θραύσεων, DSBR, και στο SDSA, μετά την αναγνώριση της DSB, ακολουθεί νουκλεολυτική επεξεργασία των άκρων της από νουκλεάσες, αποικοδομώντας τον κλώνο του 5'-άκρου προς σχηματισμό 3'-προεξοχής σε κάθε κλώνο. Η μία εκ των δύο προεξοχών στη συνέχεια εισβάλλει σε ομόλογη δίκλωνη περιοχή DNA προς δημιουργία της D-loop, και εκκινείται η νεοσύνθεση του DNA με μήτρα την ομόλογη διαθέσιμη αλληλουχία. Ωστόσο, η εισβάλλουσα προεξοχή εκτοπίζεται συχνά μετά από περιορισμένη σύνθεση και ο νεοσυντιθέμενος συμπληρωματικός κλώνος συνδέεται με την 3'-μονόκλωνη ουρά του άλλου άκρου του DSB, οδηγώντας αποκλειστικά στην παραγωγή προϊόντων χωρίς επιχιασμό, NCO (Symington, Rothstein and Lisby, 2014).

1.3.2.3. Ανασύνδεση μονού κλώνου, SSA

Το μονοπάτι ανασύνδεσης μονού κλώνου, SSA, αποτελεί μεταλλαξιγόνο μονοπάτι του HR. Το σύνθηρες υπόστρωμα του εν λόγω μονοπατιού αποτελούν οι DSB που πλαισιώνουν ομόλογες αλληλουχίες, όπως είναι αυτές που συμβαίνουν σε περιοχές επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Σχήμα 8). Πρόκειται για το μοναδικό υπο-μονοπάτι του HR το οποίο δεν απαιτεί το βήμα εισβολής του -εξαρτώμενου από την Rad51- DNA κλώνου. Αντ' αυτού, λαμβάνει χώρα επιπρόσθετη ενζυμική δραστικότητα της πρωτεΐνης Rad52, που οδηγεί στην ανασύνδεση των ssDNA (Pâques and Haber, 1999; Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Οι μη ομόλογες αλληλουχίες μεταξύ των επαναλαμβανόμενων επαναλήψεων εκτείνονται προς τα έξω, και στη συνέχεια αποκόπτονται μέσω της δράσης του συμπλόκου Rad1-Rad10 (Pâques and Haber, 1999). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απαλοιφή μιας από τις επαναλήψεις καθώς και της παρεμβαλλόμενης περιοχής (Pâques and Haber, 1999; Pfeiffer *et al.*, 2004). Δεδομένου ότι τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία είναι πολυάριθμα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το μονοπάτι SSA ενδεχομένως μεσολαβεί στις μεγάλης κλίμακας αναδιατάξεις που προκαλούν απαλοιφές αλληλουχιών οι οποίες βρίσκονται σε περιοχές μεταξύ των επαναλήψεων (Bhattacharjee and Nandi, 2016).

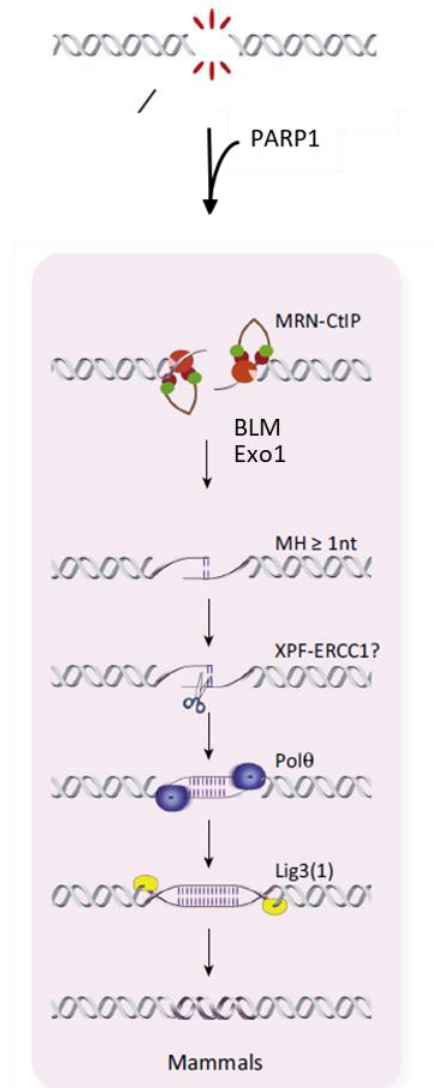


Σχήμα 8: Το μονοπάτι επιδιόρθωσης ανασύνδεσης μονού κλώνου, SSA. Η νουκλεολυτική επεξεργασία της DSB εκθέτει συμπληρωματικές μονόκλωνες 3'-ουρές, και αφού αποκαλυφθούν οι ομόλογες

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες με την απομάκρυνση νουκλεοτιδίων, αυτές συνδέονται μεταξύ τους, αφήνοντας τις μη ομόλογες αλληλουχίες που παρεμβάλλονται, να εκτείνονται προς τα έξω, οι οποίες απομακρύνονται μέσω της δράσης του συμπλόκου Rad1-Rad10 (Symington, Rothstein and Lisby, 2014).

1.3.2.4. Εναλλακτική σύνδεση των άκρων/διαμεσολαβούμενη από μικροομολογία σύνδεση των άκρων, alt-EJ/MMEJ

Η διαμεσολαβούμενη από μικροομολογία σύνδεση των άκρων αποτελεί μια ακόμη μεταλλαξιγόνο οδό επιδιόρθωση των διπλόκλωνων θραύσεων του DNA. Παρόλο που συσχετίζεται ισχυρά με τον NHEJ, το μονοπάτι αυτό διαθέτει κοινά βασικά μηχανιστικά χαρακτηριστικά με τον HR (Bhattacharjee and Nandi, 2016). Το μονοπάτι MMEJ, όπως και ο HR, ενεργοποιείται κατά κύριο λόγο κατά τις φάσεις S και G₂ του κυτταρικού κύκλου, αλλά δύναται να λειτουργήσει και κατά τη φάση G₁, με τρόπο ανεξάρτητο από τις πρωτεΐνες Ku και DNA-PKs (Truong *et al.*, 2013). Επιπροσθέτως, ο MMEJ δεν απαιτεί το σύμπλοκο LigaseIV/XRCC4/XLF, ωστόσο βασίζεται στην BLM, της οποίας ένας σημαντικός ρόλος, μεταξύ άλλων, είναι η αναστολή των CtIP/MRE11 (Keijzers *et al.*, 2014). Ο MMEJ εκκινείται με εκτομή των 5'-άκρων DNA που πλαισιώνουν την DSB, αφήνοντας πίσω 3'-προεξοχές ssDNA (Truong *et al.*, 2013). Παρότι οι μηχανισμοί MMEJ και DSBR χρησιμοποιούν τα ίδια ένζυμα νουκλεολυτικής επεξεργασίας των άκρων, τα επόμενα βήματα αυτών αποκλίνουν. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον μηχανισμό MMEJ αποτελεί η νουκλεολυτική επεξεργασία των άκρων να εκθέτει περιοχές με μικρο-ομομολογία 10-25 bp, οι οποίες εν συνεχεία επιτρέπουν την σύνδεση του ssDNA (Truong *et al.*, 2013), οδηγώντας, στη δημιουργία ενός υποστρώματος το οποίο, κατόπιν απομάκρυνσης των μη συνδεδεμένων άκρων του DNA, είναι ικανό για την κάλυψη των κενών που δημιουργούνται και την ακόλουθη σύνδεση αυτών, όπως γίνεται και στο μονοπάτι SSA (Σχήμα 9) (Sfeir and Symington, 2015).



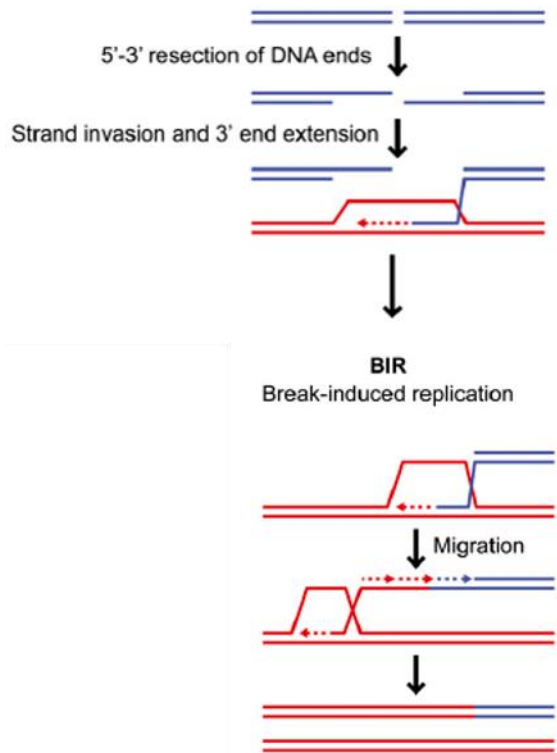
Σχήμα 9: Το μονοπάτι επιδιόρθωσης διαμεσολαβούμενης από μικροομολογία σύνδεσης των άκρων, MMEJ. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει (α) νουκλεολυτική επεξεργασία των άκρων, αρχικά από το σύμπλοκο MRN/CtIP και έπειτα από τις Exo1-BLM, (β) σύνδεση μεταξύ των μικρο-ομολογιών, MHs, (γ) απομάκρυνση των προεξεχόντων τμημάτων (flaps) από το σύμπλοκο XPF/ERCC1, (δ) σύνθεση για την πλήρωση των κενών (fill-in synthesis) μέσω της πολυμεράσης Polθ, και (ε) τελική σύνδεση των άκρων μέσω της λιγάσης I ή III (τροποποίηση από Keijzers *et al.*, 2014; Sfeir and Symington, 2015).

1.3.2.5 Επαγόμενη από θραύσεις αντιγραφής, BIR

Το μονοπάτι της επαγόμενης από θραύσεις αντιγραφής είναι ο πιο συχνός μηχανισμός επιδιόρθωσης των θραύσεων ενός ελεύθερου άκρου του DNA (one-sided DSBs), και προϋποθέτει μόνο ένα από τα δύο άκρα της DSB να εμφανίζει ομολογία με

άλλη άθικτη αλληλουχία DNA (Σχήμα 10) (Jain *et al.*, 2009). Είναι αξιοσημειωτο ότι ο μονός κλώνος ο οποίος εισβάλλει στην ομόλογη δίκλωνη αλληλουχία μπορεί να αποτελεί το μοναδικό ελεύθερο άκρο της DSB, όπως συμβαίνει στα τελομερή όταν αυτά φτάνουν σε ένα κρίσιμο μήκος (Kraus, Leung and Haber, 2001; Donnianni and Symington, 2013). Παρότι ως μηχανισμός είναι και αυτός μεταλλαξιγόνο, ο BIR είναι απαραίτητος για την επανέναρξη της αντιγραφής σε σπασμένες διχάλες αντιγραφής (broken replication forks) (Jain *et al.*, 2009). Ελλείπει δεύτερης σύλληψης άκρου (second end capture), η επιμήκυνση της εισβαλλόμενης 3'-προεξοχής που συνοδεύεται από τη μετανάστευση του βρόχου D-loop συνεχίζεται μέχρι τερματισμού λόγω συνάντησης της συγκλίνουσας διχάλας αντιγραφής ή μέχρι το τέλος του χρωμοσώματος που λειτουργεί ως μήτρα (Michel, 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται και με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής (Roumelioti *et al.*, 2016; Min, Wright and Shay, 2017; Sobinoff and Pickett, 2017).

Προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι ο μηχανισμός BIR δεν επιλέγεται σε περιπτώσεις ύπαρξης των κλασικών DSBs, όπου και τα δύο άκρα είναι διαθέσιμα προς αναζήτηση ομολογίας, οπότε και επιλέγονται άλλοι μηχανισμοί του HR (Malkova *et al.*, 2001; Llorente, Smith and Symington, 2008). Η χρήση του περιορίζεται κυρίως σε περιπτώσεις πλήρους αποσυναρμολόγησης/κατάρρευσης της διχάλας αντιγραφής (collapsed forks) ή υποχώρησης της διχάλας αντιγραφής (regressed forks), και όχι σε σταματημένες διχάλες αντιγραφής (stalled forks) (Llorente, Smith and Symington, 2008; Costantino *et al.*, 2014). Η πλειοψηφία των ερευνών διεξήχθησαν στον *Saccharomyces cerevisiae* για τη διερεύνηση του BIR (Morrow, Connelly and Hieter, 1997; Bhattacharjee and Nandi, 2016), ενώ στον άνθρωπο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2014 (Costantino *et al.*, 2014). Αξιοσημειωτο είναι ότι ο μηχανισμός BIR φαίνεται να εξαρτάται από τη δράση της Rad52, χαρακτηριστικό και του μονοπατιού SSA, και όχι τόσο από την Rad51 όπως οι υπόλοιποι μηχανισμοί του HR (Malkova, Ivanov and Haber, 1996).



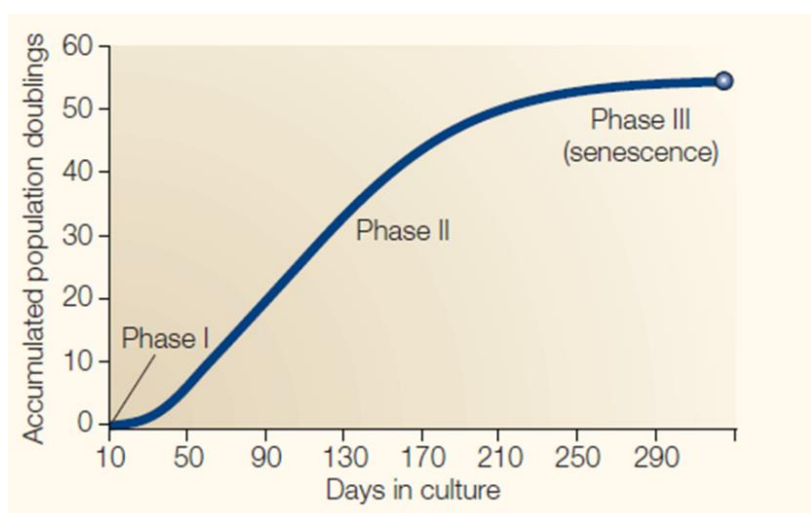
Σχήμα 10: Το μονοπάτι επιδιόρθωσης επαγόμενης από θραύσεις αντιγραφή, BIR, το οποίο αποτελεί τον συχνότερο μηχανισμό επιδιόρθωσης θραύσεων ενός ελεύθερου άκρου. Συγκεκριμένα, λαμβάνει χώρα νουκλεολυτική επεξεργασία του μονού ελεύθερου άκρου της DSB από νουκλεάσες, προς σχηματισμό 3'-προεξοχής, η οποία εν συνεχεία εισβάλλει σε ομόλογη δίκλωνη περιοχή DNA προς δημιουργία της D-loop. Απουσία δεύτερης σύλληψης άκρου (second end capture), η επιμήκυνση της εισβαλλόμενης 3'-προεξοχής που συνοδεύεται από τη μετανάστευση του βρόχου D-loop, η οποία συνεχίζεται μέχρις τερματισμού λόγω συνάντησης της συγκλίνουσας διχάλας αντιγραφής ή μέχρι το τέλος του χρωμοσώματος που λειτουργεί ως μήτρα (Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Ο συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής (Roumelioti *et al.*, 2016; Min, Wright and Shay, 2017; Sobinoff and Pickett, 2017).

Όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, το σύμπλοκο της σελτερίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των τελομερών από την αναγνώρισή τους ως DSBs και την επικείμενη ενεργοποίηση των μηχανισμών απόκρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA. Στα κύτταρα θηλαστικών, την ακεραιότητα των χρωμοσωμικών άκρων απειλούν αμφότεροι οι μηχανισμοί NHEJ και HR. Η ύπαρξη του συμπλόκου της σελτερίνης είναι απαραίτητη στη ρύθμιση της κατάλληλης επεξεργασίας του τελομερικού άκρου, η οποία επηρεάζει άμεσα τη

διατήρηση της ακεραιότητας των τελομερών κάθε χρωμοσώματος (Palm and de Lange, 2008).

1.4. Το όριο Hayflick και το «πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων»

Η πλειοψηφία των φυσιολογικών κυττάρων του ανθρώπου μπορούν να διαιρεθούν περίπου 50 φορές σε καλλιέργεια, προτού εισέλθουν στη φάση της «γήρανσης», οπότε και ελαττώνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους ώσπου παύουν να διαιρούνται και πεθαίνουν (Σχήμα 11). Το όριο αυτού του πεπερασμένου αριθμού διαιρέσεων των φυσιολογικών κυττάρων προτάθηκε από τον Leonard Hayflick τη δεκαετία του 1960, και είναι γνωστό ως «όριο Hayflick» (Hayflick and Moorhead, 1961).



Σχήμα 11: Οι τρεις φάσεις της κυτταρικής καλλιέργειας, σύμφωνα με τον L. Hayflick. Η φάση I είναι η πρωτογενής κυτταρική καλλιέργεια. Η φάση II αντιπροσωπεύει τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της περιόδου εκθετικού πολλαπλασιασμού. Η φάση III αντιπροσωπεύει την περίοδο κατά την οποία παύει ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων, αλλά ο μεταβολισμός συνεχίζεται. Τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν σε αυτή την κατάσταση για τουλάχιστον ένα χρόνο πριν από τον θάνατο (Shay and Wright, 2000).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 διαπιστώθηκε ότι οι εγγενείς ιδιότητες της αντιγραφής του DNA αποτελούν φραγμό στην πλήρη και ολοκληρωμένη αντιγραφή των τελομερικών άκρων του γραμμικού DNA (Shay and Wright, 2000). Λόγω της

φύσης της αντιγραφής του ασυνεχούς κλώνου, για την οποία είναι απαραίτητη η δημιουργία των τμημάτων Okazaki, η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να αντιγράψει πλήρως το 3'-άκρο του γραμμικού δίκλωνου DNA, καθώς δεν υπάρχει περαιτέρω DNA για την κάλυψη του κενού μεταξύ του τελευταίου τμήματος Okazaki και του άκρου, αφήνοντας μια 3'-προεξοχή (Wynford-Thomas and Kipling, 1997). Αυτό το φαινόμενο περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Alexey M. Olovnikov (Olovnikov, 1971) και James D. Watson (WATSON, 1972), και είναι γνωστό ως «end replication problem». Έτσι, η απομάκρυνση του τελευταίου τμήματος Okazaki αποκαλύπτει την προαναφερθείσα 3'-προεξοχή η οποία αποκόπτεται, με αποτέλεσμα μετά το πέρας κάθε κύκλου αντιγραφής του DNA, το μήκος των τελομερών να ελαττώνεται (Harley, Futcher and Greider, 1990; Zakian, 1995). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι περίπου 50-200 νουκλεοτίδια χάνονται ανά κυτταρική διαίρεση (Zhao *et al.*, 2008). Αυτό εξηγεί και το πεπερασμένο όριο διαιρέσεων Hayflick, των φυσιολογικών κυττάρων. Ωστόσο, η κατάσταση αυτή είναι εντελώς διαφορετική σε αθάνατους οργανισμούς, στα γαμετικά κύτταρα των ανώτερων οργανισμών και στα καρκινικά κύτταρα, καθώς διαθέτουν μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να επιμηκύνουν τα τελομερή τους, με αποτέλεσμα να διατηρούν ή ακόμη και να αυξάνουν το μήκος τους (Shay and Wright, 2000).

1.5. Μηχανισμοί επιμήκυνσης των τελομερών

1.5.1. Επιμήκυνση των τελομερών μέσω της τελομεράσης

Το 1985, οι Elizabeth Blackburn και Carol Greider παρατήρησαν μια μέχρι τότε άγνωστη ενζυμική δράση, ικανή να επιμηκύνει τις τελομερικές αλληλουχίες στο πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila* (Greider and Blackburn, 1985). Κατόπιν, ταυτοποίησαν τη δράση της «τρανσφεράσης των τελομερικών άκρων», την οποία απέδωσαν σε μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη αποτελούμενη από δύο βασικά συστατικά RNA και πρωτεΐνης, την οποία ονόμασαν «τελομεράση» (Greider and Blackburn, 1987). Το συστατικό RNA ήταν συμπληρωματικό της αλληλουχίας των τελομερικών επαναλήψεων, υποδηλώνοντας ότι δρούσε ως εκμαγείο για την προσθήκη των επαναλαμβανόμενων τελομερικών αλληλουχιών (Greider and Blackburn, 1989). Το

1989, ο Gregg Morin προσδιόρισε την αντίστοιχη δράση της τελομεράσης σε ανθρώπινα κύτταρα (Morin, 1989).

Η ανθρώπινη τελομεράση αποτελείται από δύο βασικές υπομονάδες, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) (Lingner *et al.*, 1997), και την RNA υπομονάδα, hTERC (human Telomerase RNA Component) (Feng *et al.*, 1995; Cong, Wright and Shay, 2002), καθώς και πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για τις δράσεις της (Harrington *et al.*, 1997; Holt and Shay, 1999). Η hTERC εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε όλους τους ιστούς ανεξαρτήτως από τη καθ'αυτή δράση της τελομεράσης (Avilion *et al.*, 1996), ενώ η γονιδιακή έκφραση της hTERT εκτιμάται να είναι λιγότερο από 1 έως 5 αντίγραφα ανά κύτταρο (Yi *et al.*, 1999), η οποία συσχετίζεται έντονα με την εμφάνιση ή μη, δράσης της τελομεράσης στα κύτταρα (Cong, Wright and Shay, 2002; Corey, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν πέντε φορές υψηλότερη έκφραση της τελομεράσης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Yi *et al.*, 1999). Η αλληλουχία-εκμαγείο της TERC των θηλαστικών, AAUCCCAAUC, είναι απαραίτητη τόσο για την αλληλεπίδραση με την 3'-προεξοχή του τελομερούς, όσο και για την ίδια την προσθήκη μιας επανάληψης τελομερικής αλληλουχίας ανά στάδιο επιμήκυνσης (Cong, Wright and Shay, 2002).

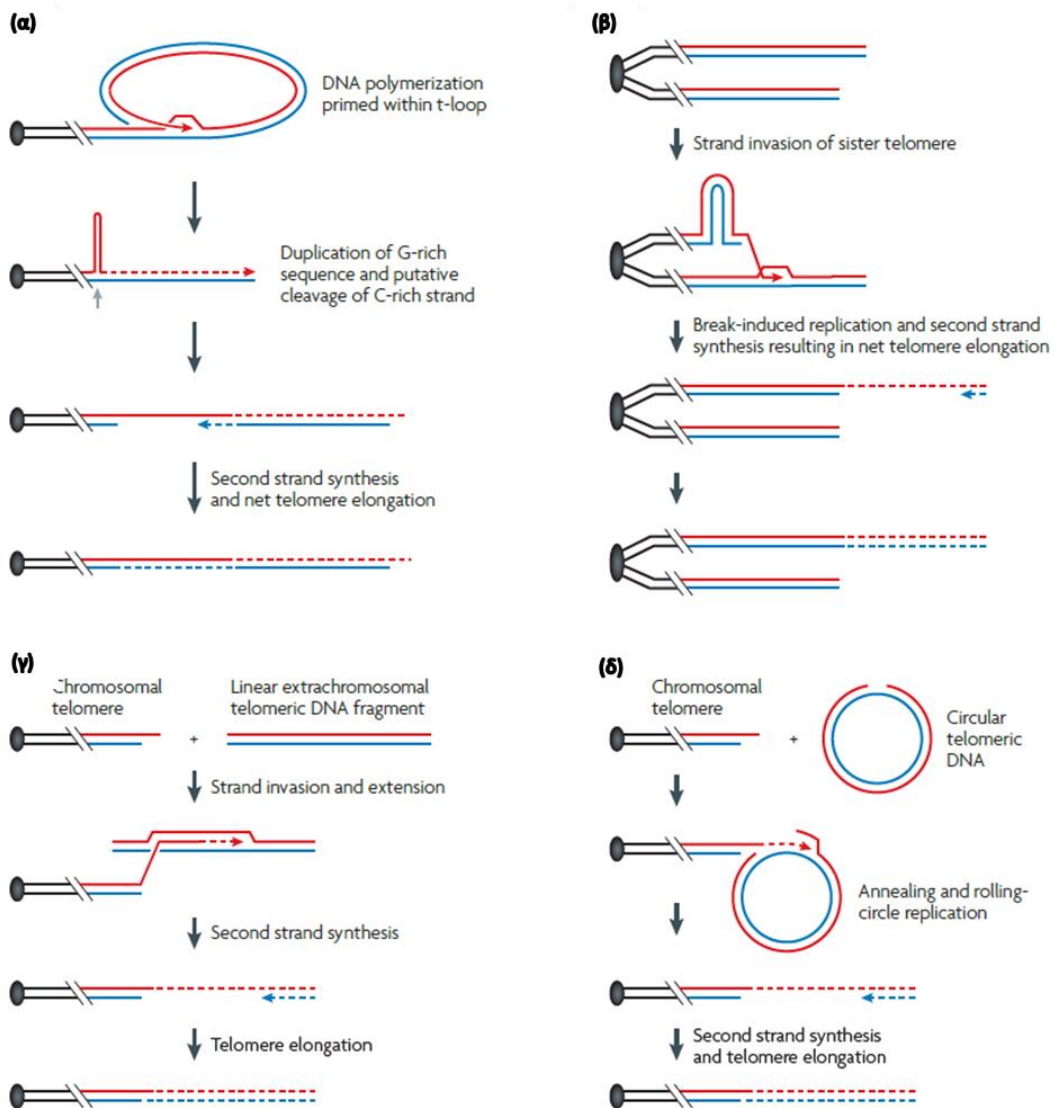
Στην πλειοψηφία των φυσιολογικών σωματικών κυττάρων του ανθρώπου, η τελομεράση δεν είναι ενεργοποιημένη. Εξαιρέσεις αποτελούν τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, τα γαμετικά κύτταρα, και ορισμένους τύπους βλαστικών κυττάρων (Shay and Bacchetti, 1997; Cong, Wright and Shay, 2002). Επιπροσθέτως, είναι πλέον ευρύτερα αποδεκτό ότι το 85-90% των καρκίνων εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα τελομεράσης, των οποίων η επιβίωση εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ενζυμική της δράση (Kim *et al.*, 1994; Shay and Bacchetti, 1997).

1.5.2. Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών, ALT

Το 10-15% των καρκίνων δεν εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα τελομεράσης και βασίζεται στον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών, ALT (Bryan *et al.*, 1997). Ο μηχανισμός ALT ενεργοποιείται συνήθως σε όγκους μεσεγχυματικής ή νευροεπιθηλιακής προέλευσης και γενικά σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Henson

and Reddel, 2010). Είναι λιγότερο κατανοητός σε σχέση με το μηχανισμό δράσης της τελομεράσης· αρχικά περιγράφηκε σε μεταλλαγμένα στελέχη ζυμομυκήτων EST (Ever-Shorter Telomeres), καθώς και σε αθανатоποιημένα καρκινικά κύτταρα που δεν εμφάνιζαν δράση τελομεράσης, ως μια διαμεσολαβούμενη από ανασυνδυασμό διαδικασία αντιγραφής του DNA (Rizki and Lundblad, 2001; Cesare and Reddel, 2010).

Παρόλο που δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος, είναι ευρέως αποδεκτό ότι στον ALT περιλαμβάνεται ένα στάδιο ανασυνδυασμού του τελομερικού DNA (Reddel, 2003; Pickett *et al.*, 2009). Σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα του Roger Reddel, η νέα τελομερική αλληλουχία συντίθεται παρουσία ομόλογης τελομερικής αλληλουχίας ως μήτρα, η οποία δεν είναι απαραίτητα χρωμοσωμική, σε έναν μηχανισμό βασισμένο στον ομόλογο ανασυνδυασμό ανεξαρτήτως αυτής της μήτρας (Cesare and Reddel, 2010). Έχουν προταθεί τέσσερις διαφορετικές μήτρες: (1) η ίδια η t-θηλειά, (2) η τελομερική αλληλουχία της αδελφής χρωματίδας, (3) η τελομερική αλληλουχία ενός διαφορετικού, μη ομόλογου χρωμοσώματος, και (4) μία εξωχρωμοσωμική τελομερική αλληλουχία (Σχήμα 12) (Cesare and Reddel, 2010).



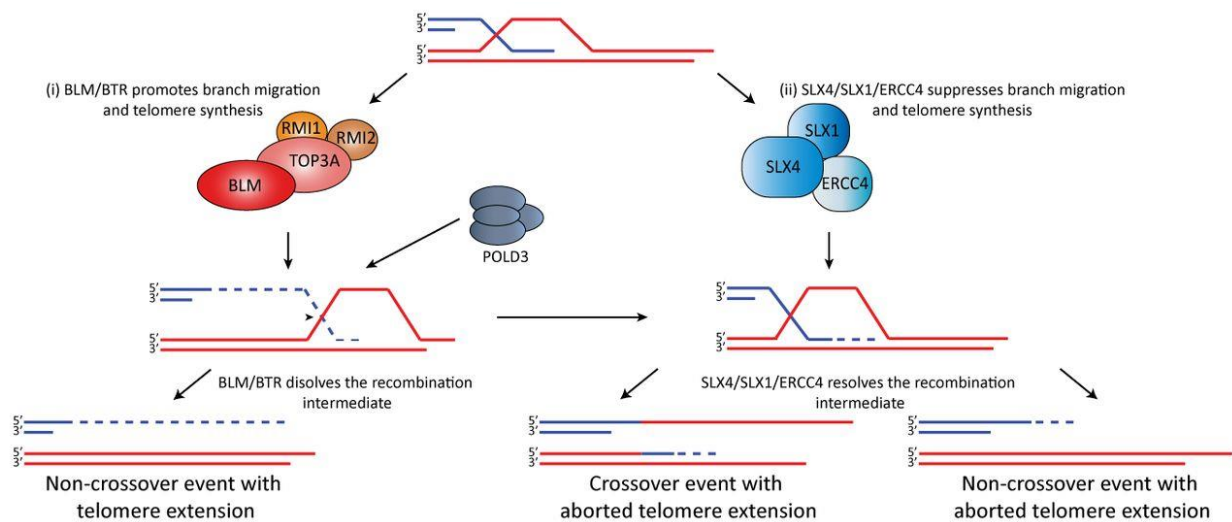
Σχήμα 12: Εναλλακτικές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την μεσολαβούμενη από ανασυνδυασμό νεοσύνθεση του τελομερικού DNA. (α) η t-loop του ίδιου τελομερούς, (β) η τελομερική αλληλουχία της αδελφής χρωατίδας, (γ) γραμμικό εξωχρωμοσωμικό τελομερικό DNA, (δ) κυκλικό εξωχρωμοσωμικό τελομερικό DNA (d). Το γκρι βέλος υποδεικνύει τη θέση της υποθετικής διάσπασης C-κλώνου (Cesare and Reddel, 2010).

Σε πρόσφατη δημοσίευση, η ομάδα των εργαστηρίων των Thanos Halazonetis και Sarantis Gagos αποσαφήνισε τον βιολογικό μηχανισμό που διέπει τον ALT στην ανθρώπινη νεοπλασία, δείχνοντας για πρώτη φορά ότι πρόκειται για μια συντηρητική διαδικασία αντιγραφής DNA, ενορχηστρωμένη από το μηχανισμό ανασυνδυαστικής επιδιόρθωσης διπλόκλωνων θραύσεων του DNA, BIR (Roumelioti

et al., 2016). Αρκετές μελέτες από μεγάλες ερευνητικές ομάδες στο πεδίο της επιδιόρθωσης του DNA και της βιολογίας των τελομερών επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα αυτά (Dilley *et al.*, 2016; Min, Wright and Shay, 2017; Sobinoff and Pickett, 2017).

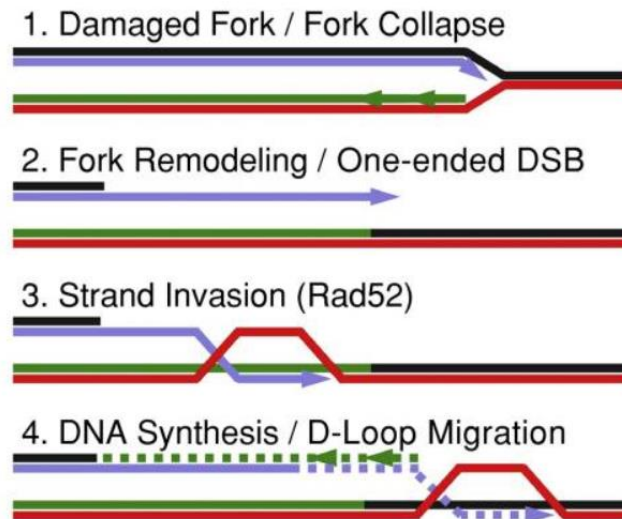
Οι Min *et al* (Min, Wright and Shay, 2017), επιβεβαίωσαν ότι ο ALT λειτουργεί μέσω του συντηρητικού τρόπου σύνθεσης DNA, δείχνοντας ότι προβλήματα στην αντιγραφή που συσχετίζονται με τον μηχανισμό ALT οδηγούν σε νεοσύνθεση DNA κατά τη φάση της μίτωσης, MiDAS (Mitotic DNA Synthesis), στα τελομερή με έναν εξαρτώμενο από τις ATR, CHK1, MRE11, και RAD52, αλλά ανεξάρτητο από τη RAD51, τρόπο. Δεδομένου ότι εξαρτάται από την πολυμεράση POLD3, η τελομερική MiDAS είναι ενδεχομένως μια συντηρητική διαδικασία σύνθεσης DNA, η οποία διαμεσολαβείται πιθανώς από τον μηχανισμό BIR (Roumelioti *et al.*, 2016; Min, Wright and Shay, 2017).

Οι Sobinoff *et al* (Sobinoff and Pickett, 2017), έδειξαν ότι το σύμπλοκο BTR (BLM-TOP3A-RMI) απαιτείται για τη διαμεσολαβούμενη από τον ALT νεοσύνθεση των τελομερών. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, το σύμπλοκο BTR διευκολύνει τη διάλυση των ενδιάμεσων δομών του ανασυνδυασμού (dissolution) που σχηματίζονται κατά την εισβολή του μονόκλωνου DNA, όπως οι HJs, ενώ το σύμπλοκο SLX4-SLX1-ERCC4 δρα ανταγωνιστικά, προωθώντας την διάσπαση των ενδιάμεσων δομών (resolution) (Σχήμα 13). Εν απουσία της επιμήκυνσης των τελομερών, η δράση του δεύτερου συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλών ποσοστών τελομερικών ανταλλαγών μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, T-SCEs. Ως εκ τούτου, παρά τη χαρακτηριστικά υψηλή τους συχνότητα, οι συσχετιζόμενες με τον ALT T-SCEs είναι πιθανό να αντιτίθενται στο μηχανισμό BIR κατά τη μίτωση (Sobinoff and Pickett, 2017).



Σχήμα 13: Μοντέλο ανασυνδυασμού και αντιγραφής των ALT τελομερών. (α) Οι πρωτεΐνες BLM και POLD3 απαιτούνται για τη μετανάστευση των βρόγχων, καθώς και την αντιγραφή του εισβάλλοντος κλώνου με βάση τη διαθέσιμη μήτρα (dissolution), οπότε προκύπτουν προϊόντα χωρίς επιχιασμό, NCO, και τελική επιμήκυνση των τελομερών. (β) Η SLX4 αναστέλλει την επιμήκυνση των τελομερών μέσω του πρόωρου διαχωρισμού των ενδιαμέσων ανασυνδυασμού που προκύπτουν από την εισβολή του τελομερικού κλώνου (resolution), οδηγώντας τελικά σε προϊόντα με και χωρίς επιχιασμό (Sobinoff and Pickett, 2017).

Ο μηχανισμός BIR επιλαμβάνεται των διπλόκλωνων θραύσεων του DNA ενός ελεύθερου άκρου, αρκεί αυτό να εμφανίζει ομολογία με άλλη άθικτη αλληλουχία DNA. Το στρες αντιγραφής αποτελεί γνωστό παράγοντα γονιδιωματικής αστάθειας (Gaillard, García-Muse and Aguilera, 2015). Η δημιουργία DSBs και κινητοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης στη διχάλα αντιγραφής μπορούν να οδηγήσουν σε αναστροφή της διχάλας, αποδόμηση ή επανεκκίνηση αυτής (Magdalou *et al.*, 2014; Zeman and Cimprich, 2014; Gaillard, García-Muse and Aguilera, 2015; Zellweger *et al.*, 2015). Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι στα θηλαστικά, η RAD52 διαδραματίζει βασικό ρόλο στον BIR στην επιδιόρθωση των αποσυναρμολογημένων διχάλων αντιγραφής του DNA (Σχήμα 14) (Sotiriou *et al.*, 2016).



Σχήμα 14: Προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο της Rad52 στον BIR. Στα θηλαστικά, η Rad52, παρουσία ή άνευ της Rad51, ενδεχομένως μεσολαβεί την εισβολή του μονόκλωνου DNA στον BIR, στην περίπτωση των αποσυναρμολογημένων διχάλων αντιγραφής του DNA (Sotiriou *et al.*, 2016).

Σε καρκίνους του ανθρώπου και αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές, ο μηχανισμός ALT παρουσιάζει πληθώρα κοινών χαρακτηριστικών. Ο ALT συσχετίζεται με μια «χαλαρή» ετεροχρωματική δομή εντοπισμένη στα τελομερή και στα κεντρομερή (García-Cao *et al.*, 2003; Gagos *et al.*, 2008). Τα μήκη των τελομερών των ALT κυττάρων εμφανίζουν ακραίες αποκλίσεις, τα οποία κυμαίνονται από πολύ βραχεία έως και 50-60 kb. Επιπροσθέτως, τα τελομερή τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυξημένου ομόλογου τελομερικού ανασυνδυασμού, όπως αυτός διαφαίνεται από την αυξημένη συχνότητα τελομερικών ανταλλαγών μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, T-SCEs (Telomeric-Sister-Chromatid Exchanges) (Graakjaer *et al.*, 2004; Pickett and Reddel, 2015), και εκτεταμένη χρωμοσωμική αστάθεια (Sakellariou *et al.*, 2013). Επιπροσθέτως, χαρακτηριστικό του μηχανισμού ALT αποτελεί η συχνή εμφάνιση των -συσχετιζόμενων με τον ALT- PML πυρηνικών σωμάτων, APBs (ALT-associated Promyelocytic Leukaemia Bodies). Τα πυρηνικά σώματα APBs αποτελούν υποπυρηνικά διαμερίσματα πλούσια στην πρωτεΐνη PML, τελομερικό DNA, καθώς και παράγοντες που συνδέονται με το καθ' αυτό τελομερές, όπως οι TRF1, TRF2, POT1, αλλά και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στους μηχανισμούς απόκρισης και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, επί παραδείγματι RAD51, RPA1,

53BP1 και το σύμπλοκο MRN (MRE11, RAD50, NBS1) (Nabetani and Ishikawa, 2011; Chung *et al.*, 2012), και θεωρούνται θέσεις της ανασυνδυαστικής επιμήκυνσης των τελομερών του μηχανισμού ALT (Draskovic *et al.*, 2009; Osterwald *et al.*, 2015).

Ένα ακόμη ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό των ALT κυττάρων αποτελεί η εμφάνιση άφθονων ποσοτήτων εξωχρωμοσωμικού, μονόκλωνου, δίκλωνου, ή συνδυασμού αυτών, κυκλικού και πλούσιου σε G ή C τελομερικού DNA, το μέσο μέγεθος του οποίου κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες bp έως 50 kb (Komosa, Root and Meyn, 2015). Παρότι δεν έχει περιγραφεί ακόμη ο μηχανισμός παραγωγής των διάφορων τύπων εξωχρωμοσωμικού τελομερικού DNA, ούτε έχει αποσαφηνισθεί η σχέση του με την εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών, η ποσοτικοποίηση του κυκλικού, C-τελομερικού DNA, που ονομάζονται C-κύκλοι (C-circles), αποτελεί σήμερα μια από τις της πλέον αξιόπιστες τεχνολογίες (C-circle assay) για την ταυτοποίηση της ενεργοποίησης του μονοπατιού ALT σε βιολογικά δείγματα (Henson *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2013).

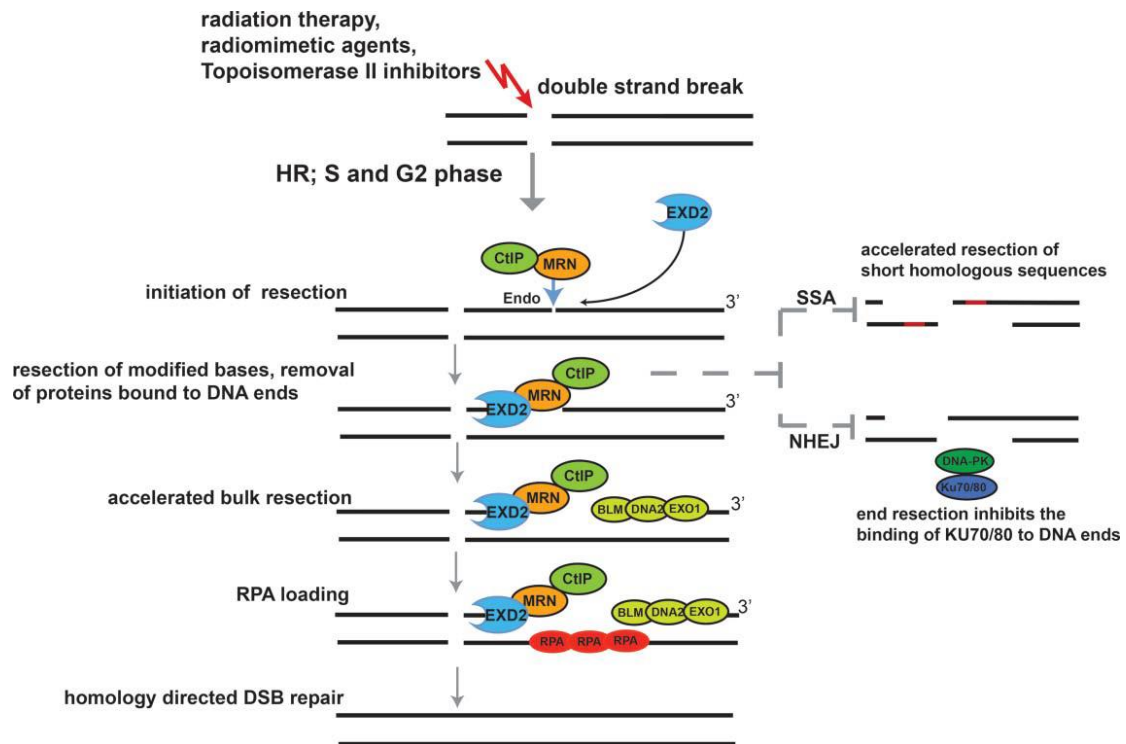
Παρά τη σημαντική πρόοδο στον τομέα της βιολογίας των τελομερών, μέχρι σήμερα υπάρχουν μόνο μερικές υποσχόμενες αντι-τελομερασικές ογκο-θεραπευτικές αγωγές, όπως ορισμένοι αποτελεσματικοί αναστολείς της τελομεράσης. Παρόλο που καταστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη διαφόρων τύπων στερεών όγκων, ωστόσο παρουσιάζουν σημαντικές αιματολογικές και ηπατοτοξικές παρενέργειες (Williams, 2013; Martínez and Blasco, 2017). Με τις τελευταίες εξελίξεις στο χώρο των ALT καρκίνων, είναι πλέον αναμενόμενο ότι οι αντι-τελομερασικές θεραπείες μπορούν να καταστούν ανεπαρκείς λόγω της ενεργοποίησης του εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών, ALT (Bollmann, 2007; Gagos *et al.*, 2008; Christodoulidou *et al.*, 2013). Επομένως, μία καθολική αντικαρκινική προσέγγιση είναι απαραίτητο να περιλαμβάνει τα μέσα για την καταστολή και των δύο γνωστών μηχανισμών διατήρησης των τελομερών στη νεοπλασία' τη δράση της τελομεράσης και τον ALT (Roumelioti *et al.*, 2016).

1.6. Ο ρόλος της πρωτεΐνης EXD2 στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

Οι δύο βασικοί μηχανισμοί που επιλαμβάνονται της επιδιόρθωσης των DSBs στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ο επιρρεπής σε λάθη NHEJ, και ο ακριβής μηχανισμός

HR (Jasin and Haber, 2016). Μετά την αναγνώριση της βλάβης, το αρχικό βήμα στον HR είναι η εκτομή των άκρων DNA που πλαισιώνουν τη DSB, η οποία μέχρι τώρα θεωρείται πως πραγματοποιείται από το σύμπλοκο MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) και την πρωτεΐνη CtIP, αποτέλεσμα της δράσης των οποίων αποτελεί η δημιουργία μικρών τμημάτων μονόκλωνου DNA, ssDNA (Symington and Gautier, 2011; Symington, 2014; Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Ακολούθως, τα ήδη επεξεργασμένα άκρα υφίστανται περεταίρω νουκλεολυτική επεξεργασία από τις νουκλεάσες EXO1 ή DNA2, σε συνεργασία με την ελικάση BLM, προς παραγωγή μακρύτερων 3'-προεξοχών ssDNA (Mimitou and Symington, 2008), οι οποίες δεσμεύονται από την RPA. Η αντικατάσταση της RPA από Rad51, κατά τρόπο εξαρτώμενο από την BRCA2, οδηγεί στο σχηματισμό ινιδίων νουκλεοπρωτεΐνης ssDNA-Rad51, απαραίτητων για την αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών προς ανασυνδυασμό (San Filippo, Sung and Klein, 2008; Symington, Rothstein and Lisby, 2014).

Αναστολή της δράσης ενδονουκλεάσης της MRE11 του συμπλόκου MRN προσδίδει ισχυρότερα ελαττωματική νουκλεολυτική επεξεργασία σε σχέση με την αναστολή της αντίστοιχης δράσης εξωνουκλεάσης, υποδηλώνοντας ότι άλλες νουκλεάσες μπορεί να εμπλέκονται στη νουκλεολυτική επεξεργασία της αρχικής DSB (Nieminuszczy, Broderick and Niedzwiedz, 2016). Σε πρόσφατη δημοσίευση, η ομάδα του Wojciech Niedzwiedz ταυτοποίησε την πρωτεΐνη EXD2 ως ένα νέο συμπράγοντα του συμπλόκου MRN, με δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης, η οποία επιταχύνει την εκτομή των διπλόκλωνων θραύσεων του DNA, προωθώντας τον HR και κατ'επέκταση προστατεύοντας το κύτταρο από την εμφάνιση χρωμοσωμικής αστάθειας (Σχήμα 15) (Broderick *et al.*, 2016). Η EXD2, οδηγεί στην ταχύτερη παραγωγή μεγαλύτερου μήκους μονόκλωνου DNA, που ενδεχομένως αποτελεί ένα καλύτερο υπόστρωμα για τη δράση των BLM-DNA2/EXO1 στη συνέχεια (Broderick *et al.*, 2016).



Σχήμα 15: Μοντέλο του πιθανού ρόλου της EXD2 στην καταστολή της γενωμικής αστάθειας. Η EXD2 επιταχύνει την προερχόμενη από το σύμπλοκο MRN/CtIP νουκλεολυτική επεξεργασία του DNA. Στη συνέχεια, η EXO1 ή η DNA2, σε συνδυασμό με την BLM, παράγουν μακρύτερες 3'-ουρές ssDNA. Η RPA που καλύπτει το ssDNA στη συνέχεια αντικαθίσταται από την Rad51 για την προώθηση της εισβολής των 3'-προεξοχών και τον HR. Μετά το πέρας της διεργασίας αυτής, τα επεξεργασμένα άκρα της DSB δεν αποτελούν πλέον κατάλληλα υποστρώματα για τη δράση των μηχανισμών SSA ή NHEJ (Nieminuszczy, Broderick and Niedzwiedz, 2016).

Το σύμπλοκο MRN είναι απαραίτητο συστατικό του μηχανισμού ALT (Zhong *et al.*, 2007). Καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης NBS1 του συμπλόκου MRN δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα των RAD50 ή MRE11. Καταστολή της RAD50 οδηγεί στην καταστολή και εξάντληση της NBS1 στα κύτταρα, ενώ η καταστολή της MRE11 οδηγεί στην καταστολή και πλήρη εξάντληση και των τριών μελών του συμπλόκου MRN στα κύτταρα. Καθεμία από τις προαναφερθείσες παρεμβάσεις έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μήκους των τελομερών, αλλά και την εμφάνιση μειωμένου αριθμού APBs. Επιπροσθέτως, ο μηχανισμός ALT φαίνεται πως ρυθμίζεται αρνητικά από τις EXO1 και DNA2 (O'Sullivan *et al.*, 2014). Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την πρόσφατη εμπλοκή της BLM στην BIR-διαμεσολαβούμενη

τελομερική σύνθεση κατά τη μίτωση (MIDAS), καθώς και τη συχνή συνεντόπιση συστατικών του HR με τα τελομερή και τα πυρηνικά σωμάτια APBs που αντιτίθεται στην επιμήκυνση των τελομερών με τον μηχανισμό ALT μέσω της επαγωγής των T-SCEs (Min, Wright and Shay, 2017), καθιστούν την EXD2 νέα πιθανή συνιστώσα των μηχανισμών διατήρησης της ομοιόστασης των τελομερών.

1.7. Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση και αποσαφήνιση των τελομερικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στην εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών, ALT, και της εμπλοκής της εξωνουκλεάσης EXD2 σε αυτούς τους μηχανισμούς.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

2.1.1. Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1x, Gibco
- Βοεϊός εμβρυϊκός ορός αίματος (Fetal Bovine Serum, FBS) 10% v/v, Gibco
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Pen/Strep) 10 mg/mL, Gibco
- Phosphate-buffered saline, PBS 10x, Gibco
- Τρυψίνη 10x, Gibco

2.1.2. Μέθοδος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται χρήση των εξής κυτταρικών σειρών: (1) επιθηλιακά κύτταρα οστεοσαρκώματος ανθρώπου, U2OS, (2) καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, HeLa, και (3) Επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδή χιτώνα ανθρώπου αθανатоποιημένα με hTERT, RPE1. Αυτά καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% v/v CO₂ σε φλάσκες με φίλτρο στο πώμα. Ο χειρισμός τους γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής. Όταν το ποσοστό κάλυψης της εκάστοτε φλάσκας από τα κύτταρα είναι μεγαλύτερο του 85%, ακολουθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων με τη χρήση PBS 1x για πλύσεις, και τρυψίνη 0.05% w/v για την αποκόλληση αυτών από την επιφάνεια της φλάσκας, στην οποία βρίσκονται προσκολλημένα. Μετά την αδρανοποίηση της τρυψίνης με τη χρήση θρεπτικού DMEM (συμπληρωμένο με FBS 10% v/v και Pen/Strep 10% v/v), ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1100 rpm για 5 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, και το ίζημα κυττάρων επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα DMEM, μέρος του οποίου εισάγεται στην ίδια ή σε νέα φλάσκα με επιπλέον αραιώση σε DMEM.

2.2. Συλλογή μεταφασικών χρωμοσωμάτων

2.2.1. Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1x, Gibco
- Phosphate-buffered saline, PBS 10x, Gibco
- Τρυψίνη 10x, Gibco
- N-δεακέτυλο-N-μέθυλοκολχικίνη (Colcemid) 10 mg/mL, Gibco
- Μεθανόλη, Applichem
- Οξικό Οξύ, Sigma
- Υποτονικό διάλυμα KCl 0.0075 M, Carlo Erba

2.2.2. Μέθοδος

Στις κυτταρικές καλλιέργειες προστίθεται colcemid τελικής συγκέντρωσης 10 µg/mL για κατάλληλο χρονικό διάστημα (1-2h ανάλογα την κυτταρική σειρά), οι οποίες παραμένουν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% v/v CO₂, μέχρι το πέρας της διαδικασίας επώασης με την colcemid. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της εκάστοτε φιάσκας συλλέγεται με τη βοήθεια τρυψίνης 0.05% v/v, και φυγοκεντρείται στις 1100 rpm για 10min στους 4°C. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5 mL KCL 0.0075 M, το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Η προσθήκη του υποτονικού διαλύματος γίνεται στάγδην και αφήνεται μετά από ήπια ανάδευση με γυάλινη πιπέττα Pasteur για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 20 min, προστίθεται 1 mL μονιμοποιητικού διαλύματος CH₃OH/CH₃COOH, 3:1, έπειτα ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με παραπάνω. Ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις του ιζήματος με 5 mL και 2x 3 mL μονιμοποιητικού με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις. Μετά το πέρας της τελευταίας πλύσης, το ίζημα με τα 3 mL μονιμοποιητικού φυλάσσεται στους 4°C επ'αόριστον με σκοπό την επίστρωση των παραλειφθέντων μεταφασικών χρωμοσωμάτων σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες.

Η επίστρωση στις αντικειμενοφόρους λαμβάνει χώρα παρουσία υγρασίας μεγαλύτερης από 40%, μετά από κατάλληλο καθαρισμό αυτών, εμβάπτισμα σε ζεστό νερό, και έκπλυση με κατάλληλη ποσότητα μονιμοποιητικού διαλύματος. Την επίστρωση ακολουθεί στέγνωμα των πλακών και αποθήκευση στους 4°C.

2.3. Φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση, FISH

2.3.1. Υλικά

- Phosphate-buffered saline, PBS 10x, Gibco
- SSC 20x, Gibco
- RNase 100 µg/mL, Rosche, σε SSC 2x
- TBS 10x (Tris-HCl 0.5 M, Sigma, pH=7.6, NaCl 1.5 M, Applichem)
- Φορμαλδεΰδη 37% v/v, Carlo Erba, σε TBS 1x προς χρήση 3.7% v/v
- HCl 10 mM, Sigma
- Πepsίνη 0.02 % w/v, Applichem
- Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10 mM, Sigma, φορμαμίδιο 70%, Applichem
- Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 100% v/v, Applichem
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris-HCl 0.1 M, Sigma, NaCl 0.15 M, Applichem, Tween-20 0.08% v/v, Applichem, pH=7-7.5
- DAPI 0.1 µg/mL-Vectashield, Vector Laboratories
- PNA τελομερικοί ανιχνευτές-probes 10 µM: Cy3-(TTAGGG)₃, FITC-(CCCTAA)₃, Biosynthesis

2.3.2. Μέθοδος

Η φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση, FISH, αποτελεί τεχνολογία ανίχνευσης μακρομορίων η οποία βασίζεται στη συμπληρωματική φύση των κλώνων DNA ή των υβριδίων DNA/RNA. Οι PNA (Peptide Nucleic Acid) ανιχνευτές είναι συνθετικά πολυμερή τύπου DNA/RNA, στους οποίους ο σακχαροφωσφορικός σκελετός έχει αντικατασταθεί από επαναλαμβανόμενα μόρια N-(2-αμινοαιθυλ)-γλυκίνης, τα οποία είναι ηλεκτρικά ουδέτερα και ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς. Οι PNA ανιχνευτές

σχηματίζουν ισχυρότερους δεσμούς PNA/DNA σε σχέση με τους δεσμούς DNA/DNA, λόγω της απουσίας των ηλεκτροστατικών απώσεων του σακχαροφωσφορικού σκελετού, ενώ αναγνωρίζονται με μεγαλύτερη δυσκολία από νουκλεάσες, σε σχέση με τους DNA ανιχνευτές. Τα παραπάνω καθιστούν τους PNA ανιχνευτές ιδιαίτερα πλεονεκτικούς και χρήσιμους σε τεχνικές σήμανσης του DNA.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται σε διάλυμα PBS 1x για 2 λεπτά. Κατόπιν, προστίθενται 100 μ L διαλύματος RNase, εκάστοτε πλάκα καλύπτεται με γυάλινη καλυπτρίδα 24 x 60 mm, και τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο 37°C για 1 h. Μετά το πέρας αυτής, οι πλάκες εμβαπτίζονται σε διάλυμα PBS 1x για 1 min, προς αφαίρεση της καλυπτρίδας. Κατόπιν, εκπλύνονται σε κυβέττα με TBS 1x για 3 min, εμβαπτίζονται σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 3.7% v/v για 2 min, και τέλος εκπλύνονται 2 φορές με TBS 1x για 5 λεπτά έκαστη. Κατόπιν, οι πλάκες τοποθετούνται σε προθερμασμένο διάλυμα πεψίνης-HCl στους 37°C για 10 min, εκπλύνονται 2 φορές με TBS 1x για 5 min έκαστη, αφυδατώνονται με σειρά από παγωμένες αιθανόλες συγκέντρωσης 70%, 85%, 100% για 2 min έκαστη, και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα. Στις στεγνές αντικειμενοφόρους προστίθενται 10 μ L διαλύματος υβριδισμού στο οποίο προηγουμένως έχουν διαλυθεί οι κατάλληλες ποσότητες των τελομερικών PNA ανιχνευτών. Οι πλάκες καλύπτονται με γυάλινη καλυπτρίδα, επωάζονται στους 80-85°C για 5 min με σκοπό την αποδιάταξη του DNA, και αφήνονται σε συνθήκες υγρασίας στο σκοτάδι για 1 h. Μετά το πέρας αυτής, οι πλάκες εκπλύνονται με PBS 1x προς αφαίρεση της καλυπτρίδας και τοποθετούνται σε κυβέττα που περιέχει προθερμασμένο διάλυμα έκπλυσης, στο σκοτάδι και στους 65°C για 5 min. Ακολουθούν 5 πλύσεις με PBS 1x (2x 5 min, 3x 10 min) στο σκοτάδι, και αφυδάτωση με την ίδια σειρά από αιθανόλες. Αφού στεγνώσουν στον αέρα, γίνεται προσθήκη DAPI-Vectashield στις πλάκες, οι οποίες καλύπτονται με γυάλινες καλυπτρίδες.

Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων γίνεται με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1, της εταιρείας Zeiss, με χρήση 63x φακού, CCD κάμερας, και τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems.

2.4. Προσδιορισμός χρωμοσωμικού προσανατολισμού με φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση, CO-FISH

2.4.1. Υλικά

- 5-βρωμο-2'-δεοξουριδίνη/κυτοσίνη, BrdU/C, Sigma, τελική συγκέντρωση 10 μ M
- Phosphate-buffered saline, PBS 10x, Gibco
- SSC 20x, Gibco
- RNase 100 μ g/mL, Rosche, σε SSC 2x
- Hoechst 33342 0.5 μ g/mL, Sigma, σε SSC 2x
- Εξωνουκλεάση ExoIII, stock 10.000 U/mL, New England Biolabs
- Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10 mM, Sigma, φορμαμίδιο 70%, Applichem
- Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 100% v/v
- Διάλυμα έκπλυσης I: Tris-HCl 0.01 M, Sigma, BSA 0.1% v/v, φορμαμίδιο 70% v/v, pH=7-7.5
- Διάλυμα έκπλυσης II: Tris-HCl 0.1 M, Sigma, NaCl 0.15 M., Applichem, Tween-20 0.08% v/v, Applichem, pH=7.4
- DAPI 0.1 μ g/mL-Vectashield, Vector Laboratories
- PNA τελομερικοί ανιχνευτές-probes 10 μ M: Cy3-(TTAGGG)₃, FITC-(CCCTAA)₃, Biosynthesis

2.4.2. Μέθοδος

Η παρούσα μέθοδος βασίζεται στην ενσωμάτωση της 5-βρωμο-2'-δεοξουριδίνης/δεοξυκυτοσίνης, BrdU/C στους νεοσυντιθέμενους κλώνους DNA κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, ακολουθούμενη από φωτόλυση και πέψη των νεοσυντιθέμενων κλώνων με εξωνουκλεάση, προς δημιουργία μονόκλωνων αδελφών χρωματίδων, οι οποίες αποτελούνται αποκλειστικά από το μητρικό DNA.

Στις κυτταρικές καλλιέργειες προστίθεται κατάλληλη ποσότητα BrdU/C (τελική συγκέντρωση 10 μ M) για 16 h (χρονικό διάστημα προσαρμόσιμο ανάλογα την κυτταρική σειρά). Σκοπό αποτελεί η ενσωμάτωση της BrdU/C στο DNA κατά τον

πρώτο κύκλο αντιγραφής (1st round), και συλλογή των κυττάρων και κατ'επέκταση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων προτού ξεκινήσει ο δεύτερος κύκλος της αντιγραφής (2nd round). Χαρακτηριστικός είναι ο διαφορικός χρωματισμός (κόκκινο-πράσινο) των τελομερικών σημάτων στον πρώτο κύκλο, ενώ στον δεύτερο αυτός γίνεται αποκλειστικά κίτρινος, παράγωγο του πλήρους συνεντοπισμού των δύο χρωμάτων.

Μετά τη συλλογή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται σε διάλυμα PBS 1x για 2 λεπτά. Κατόπιν, προστίθενται 100 μ L διαλύματος RNase, εκάστοτε πλάκα καλύπτεται με γυάλινη καλυπτρίδα 24 x 60 mm, και τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο 37°C για 1 h. Μετά το πέρας αυτής, οι πλάκες εμβαπτίζονται σε διάλυμα PBS 1x για 1 min, προς αφαίρεση της καλυπτρίδας. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα Hoechst 33342 για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και έκθεση των πλακών σε UV ακτινοβολία 365nm (Statalinker 1800, 0.180 J/m²) για 45 min. Μετά το πέρας αυτών, οι πλάκες επωάζονται με ExoIII στους 37°C για 15 min, εκπλύνονται με PBS 1x, αφυδατώνονται με σειρά από παγωμένες αιθανόλες συγκέντρωσης 70%, 85%, 100% για 2 min έκαστη, και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα. Στις στεγνές αντικειμενοφόρους προστίθενται 10 μ L διαλύματος υβριδισμού στο οποίο προηγουμένως έχει διαλυθεί η κατάλληλη ποσότητα του Cy3-PNA ανιχνευτή. Οι πλάκες καλύπτονται με γυάλινη καλυπτρίδα και αφήνονται σε συνθήκες υγρασίας στο σκοτάδι για 1 h. Μετά το πέρας αυτής, οι πλάκες εκπλύνονται με το διάλυμα έκπλυσης I προς απομάκρυνση του PNA ανιχνευτή. Στη συνέχεια, προστίθεται ο FITC-PNA ανιχνευτής και αφήνεται σε συνθήκες υγρασίας στο σκοτάδι για 1 h. Ακολουθούν εκπλύσεις με τα διαλύματα έκπλυσης I (2 φορές από 15 min έκαστη), II (3 φορές από 5 min έκαστη), 3 πλύσεις PBS 1x από 10 min έκαστη, και αφυδάτωση με την ίδια σειρά από αιθανόλες. Αφού στεγνώσουν στον αέρα, γίνεται προσθήκη DAPI-Vectashield στις πλάκες, οι οποίες καλύπτονται με γυάλινες καλυπτρίδες.

Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων γίνεται με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1, της εταιρείας Zeiss, με χρήση 63x φακού, CCD κάμερας, και τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems.

2.5. Ποσοτικοποίηση τελομερικού μήκους με τη μέθοδο Q-FISH, βασισμένη στην φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση, FISH

2.5.1. Υλικά

Τα υλικά είναι αυτούσια με αυτά που αναφέρονται στην παράγραφο 2.3.1., στην περιγραφή της μεθόδου φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης, FISH.

2.5.2. Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή αποτελεί εργαλείο ποσοτικοποίησης του τελομερικού μήκους. Βασίζεται στην απεικόνιση και μέτρηση της συνολικής έντασης φθορισμού των τελομερικών άκρων σε σύγκριση με την ένταση φθορισμού του κεντρομερούς του χρωμοσώματος 2, με τη χρήση ανιχνευτών που φέρουν φθοριοχρώματα. Το κεντρομερές 2 χρησιμοποιείται ως αναφορά για την ανάλυση του τελομερικού μήκους στη μέθοδο αυτή (Perner *et al.*, 2003).

Η μέθοδος είναι η ίδια με αυτή που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.2., στην περιγραφή της μεθόδου φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης, FISH. Η μοναδική διαφορά έγκειται στην προσθήκη ταυτόχρονα Cy3-PNA ανιχνευτή με ειδικό FITC-ανιχνευτή για το κεντρομερές του χρωμοσώματος 2. Ωστόσο, με δοκιμή ποσοτικοποίησης του μήκους των τελομερών με χρήση του κεντρομερικού ανιχνευτή, αλλά και χωρίς αυτόν, παρατηρούμε ότι η ποσοτικοποίηση δεν παρουσιάζει διαφορές. Για το λόγο αυτό, ως μέθοδος χρησιμοποιείται η κλασική μέθοδος FISH, χωρίς περαιτέρω διαφοροποιήσεις.

Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων γίνεται με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1, της εταιρείας Zeiss, με χρήση 63x φακού και CCD κάμερας. Οι φωτογραφίες αυτές επεξεργάζονται, καρυστυπούνται και πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση του φθορισμού με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems.

2.6. Φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση μη αποδιατακτικών συνθηκών, ND-FISH

2.6.1. Υλικά

- Phosphate-buffered saline, PBS 10x, Gibco
- SSC 20x, Gibco
- RNase 100 µg/mL, Rosche, σε SSC 2x
- HCl 10 mM, Sigma
- Πεψίνη 0.02 % w/v, Applichem
- Διάλυμα προεργασίας: HCl 10 mM με πεψίνη 0.02 % w/v
- Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10 mM, Sigma
- Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 100% v/v
- Διάλυμα έκπλυσης: SSC 4x, Tween-20 0.2% v/v
- DAPI 0.1 µg/mL-Vectashield, Vector Laboratories
- PNA τελομερικοί ανιχνευτές-probes 10 µM: Cy3-(TTAGGG)₃, FITC-(CCCTAA)₃, Biosynthesis

2.6.2. Μέθοδος

Η φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση άνευ αποδιατακτικών συνθηκών, ND-FISH, αποτελεί τροποποίηση της κλασικής μεθόδου FISH, με τη διαφορά ότι δεν προηγείται αποδιάταξη του DNA πριν και κατά την υβριδοποίηση. Τοιουτοτρόπως, ο ειδικός PNA-ανιχνευτής προσδένεται αποκλειστικά σε περιοχές μονόκλωνου DNA.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται σε διάλυμα PBS 1x για 2 λεπτά. Κατόπιν, προστίθενται 100 µL διαλύματος RNase, εκάστοτε πλάκα καλύπτεται με γυάλινη καλυπτρίδα 24 x 60 mm, και τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο 37°C για 1 h. Μετά το πέρας αυτής, οι πλάκες εμβαπτίζονται σε διάλυμα PBS 1x για 1 min, προς αφαίρεση της καλυπτρίδας. Κατόπιν, εκπλύνονται δύο φορές σε κυβέττα με SSC 2x για 5 min, έπειτα εμβαπτίζονται στο διάλυμα προεπεξεργασίας για 2 min στους 37°C, και τέλος εκπλύνονται 2 φορές με PBS 1x για 5 λεπτά έκαστη. Κατόπιν, οι πλάκες αφυδατώνονται με σειρά από παγωμένες αιθανόλες συγκέντρωσης 70%, 85%, 100% για 2 min έκαστη, και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα. Κατά το στέγνωμα των

πλακών, το διάλυμα του PNA-ανιχνευτή (10 µL διαλύματος υβριδισμού στο οποίο προηγουμένως έχουν διαλυθεί οι κατάλληλες ποσότητες των τελομερικών PNA ανιχνευτών) αποδιατάσσεται για 5 min στους 37°C, τοποθετείται αμέσως σε πάγο, και κατόπιν προστίθεται στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Έπειτα καλύπτονται με γυάλινη καλυπτίδα και αφήνονται σε συνθήκες υγρασίας στο σκοτάδι για 2 h. Μετά το πέρας αυτών, οι πλάκες εκπλύνονται με PBS 1x προς αφαίρεση της καλυπτρίδας και τοποθετούνται σε κυβέττα που περιέχει το διάλυμα έκπλυσης, στο σκοτάδι για 15 min. Ακολουθούν 5 πλύσεις με PBS 1x (2x 5 min, 3x 10 min) στο σκοτάδι, και αφυδάτωση με την ίδια σειρά από αιθανόλες. Αφού στεγνώσουν στον αέρα, γίνεται προσθήκη DAPI-Vectashield στις πλάκες, οι οποίες καλύπτονται με γυάλινες καλυπτρίδες.

Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων γίνεται με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1, της εταιρείας Zeiss, με χρήση 63x φακού, CCD κάμερας, και τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems.

2.7. Ανοσοφθορισμός, IF

2.7.1. Υλικά

- Phosphate-buffered saline, PBS 10x, Gibco
- Triton X-100 0,2% v/v, AppliChem
- BSA 1% w/v, Sigma, σε PBS 1x
- 1^ο-γενή αντισώματα διαφόρων εταιρειών
- 2^ο-γενή αντισώματα: anti-mouse Alexa fluor 488 nm, anti-mouse Alexa fluor 594 nm, anti-rabbit Alexa fluor 594 nm, Molecular probes
- DAPI 0.1 µg/mL-Vectashield, Vector Laboratories

2.7.2. Μέθοδος

Η μέθοδος βασίζεται στην σήμανση και ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων με τη χρήση αντισωμάτων ειδικά για επιτόπους αυτών, και την ακόλουθη ανίχνευση των τελευταίων με αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα.

Οι κυτταρικές σειρές επιστρώνονται και καλλιεργούνται σε ειδικές στρογγυλές γυάλινες καλυπτρίδες. Έχει προηγηθεί αποστείρωση αυτών και επιπλέον έκθεση σε UV ακτινοβολία. Όταν το ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας της εκάστοτε καλυπτρίδας είναι το επιθυμητό, ακολουθεί έκπλυση του θρεπτικού υλικού με PBS 1x και μονιμοποίηση με μεθανόλη στους -20°C για 10min. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με PBS 1x και αποθήκευση στους 4°C για έως μία βδομάδα. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη Triton X-100 για 12 min στους 4°C, έκπλυση με PBS 1x 2 φορές από 5 min έκαστη, και κάλυψη με 1% BSA w/v για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με πρωτοταγές αντίσωμα αραιωμένο σε BSA 1% w/v, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία υγρασίας. Μετά το πέρας αυτής ακολουθούν 3 πλύσεις με PBS 1x, διάρκειας 10 min έκαστη, και επώαση με το 2^ο-γενές αντίσωμα αραιωμένο σε BSA 1% w/v για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία υγρασίας και σκοταδιού. Ακολουθούν 3 πλύσεις με PBS 1x, διάρκειας 10 min έκαστη. Αφού στεγνώσουν οι καλυπτρίδες στον αέρα, γίνεται προσθήκη DAPI-Vectashield σε αντικειμενοφόρο πλάκα, το οποίο καλύπτεται από τις καλυπτρίδες. Οι καλυπτρίδες σταθεροποιούνται με προσθήκη βερνικιού στα άκρα τους.

Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων γίνεται με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1, της εταιρείας Zeiss, με χρήση 63x φακού, CCD κάμερας, και τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ και το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας ImageJ.

2.8. Φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση συζευγμένη με ανοσοφθορισμό, IF-FISH

2.8.1. Υλικά

Τα υλικά είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην παράγραφο 2.3.1., στην περιγραφή της μεθόδου φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης, FISH, καθώς και στην παράγραφο 2.7.1., στην περιγραφή της μεθόδου ανοσοφθορισμού, IF.

2.8.2. Μέθοδος

Η μέθοδος IF-FISH αποτελεί σύζευξη των μεθόδων PNA-FISH και IF. Επομένως, οι επιθυμητές κυτταρικές σειρές επιστρώνονται και καλλιεργούνται σε ειδικές στρογγυλές γυάλινες καλυπτρίδες, και ακολουθείται το πρωτόκολλο της παραγράφου 2.7.2., μη συμπεριλαμβανομένου του βήματος προσθήκης DAPI-Vectashield. Συνεπώς, μετά την τελευταία έκπλυση με PBS 1x, ακολουθεί εκ νέου μονιμοποίηση με μεθανόλη στους -20°C για 10min. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με PBS 1x και αποθήκευση στους 4°C για συνέχιση του πρωτοκόλλου την επόμενη ημέρα. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι αυτό της παραγράφου 2.3.2., προσαρμοσμένο στο μέγεθος των καλυπτρίδων, αντί των αντικειμενοφόρων πλακών. Για την εφαρμογή του, οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε 24-well plate, και κάθε αντιδραστήριο προστίθεται με μέγιστο όγκο τα 200 μL . Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το στάδιο προσθήκης HCl 10 mM, καθώς όταν προηγείται IF, δεν γίνεται προσθήκη πεψίνης στο διάλυμα HCl. Επιπλέον, οι PNA ανιχνευτές προστίθενται σε τελικό όγκο 3-5 μL και οι καλυπτρίδες καλύπτονται με parafilm ή εναλλακτικά τοποθετούνται σε πλαστική/γυάλινη επιφάνεια με τα κύτταρα προς την πλευρά των PNA-ανιχνευτών. Μετά την επώαση με τους ανιχνευτές, οι καλυπτρίδες επιστρέφονται στα πηγάδια του 24-well plate, όπου λαμβάνουν χώρα οι εκπλύσεις των επόμενων σταδίων. Στο τελευταίο στάδιο, μετά την προσθήκη αιθανόλης 100% v/v, οι καλυπτρίδες στεγνώνουν στον αέρα. Κατόπιν, γίνεται προσθήκη DAPI-Vectashield σε αντικειμενοφόρο πλάκα, το οποίο καλύπτεται από τις καλυπτρίδες. Οι καλυπτρίδες σταθεροποιούνται με προσθήκη βερνικιού στα άκρα τους.

Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων γίνεται με τη χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1, της εταιρείας Zeiss, με χρήση 63x φακού, CCD κάμερας, και τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ και το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας ImageJ.

2.9. Παραγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτήρια

2.9.1. Μετασηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων, Transformation

2.9.1.1 Υλικά

- Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* DH5A (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)
- Πλασμιδιακό DNA: pWPIR-eGFP, pWPIR-hTRF2dBdC-eGFP, pWPIR-hTRF2WT-eGFP (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Ε. Gilson)
- LB-άγαρ, Sigma (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)
- LB-broth, Invitrogen (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)

2.9.2.2 Μέθοδος

Σε 50 μL ddH₂O προστίθενται περίπου 2.5 μg επιθυμητού πλασμιδίου, εκ των οποίων τα 5 μL προστίθενται σε 50 μL επιδεκτικών κυττάρων και το μείγμα ανακινείται ήπια. Τα κύτταρα αφήνονται για 20-25 min στον πάγο και έπειτα προκαλείται θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται αμέσως στον πάγο για 5 min και κατόπιν προστίθενται 370 μL θρεπτικού LB. Γίνεται επώαση σε ειδικό κλίβανο για 1 h, στις 250 rpm, στους 37°C. Έπειτα, 200 μL καλλιέργειας απλώνονται με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου σε τρυβλίο στερεού θρεπτικού LB-άγαρ που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό για επιλογή. Ακολουθεί επώαση για 12-16 h σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C.

2.9.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασηματισμένων βακτηρίων

2.9.2.1. Υλικά

- LB-broth, Invitrogen (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)

- Αμπικικιλίνη, τελική συγκέντρωση: 100 µg/mL, Calbiochem (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)
- Nucleoband Xtra Midi Kit, Macherey-Nagel (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)
- Ισοπροπανόλη, AppliChem
- Αιθανόλη 70%, AppliChem

2.9.2.2. Μέθοδος

Από τα τρυβλία στο οποίο έχει γίνει επιτυχημένος μετασχηματισμός με μεγάλο αριθμό αποικιών, επιλέγεται μονήρης αποικία με τη βοήθεια αποστειρωμένου ρίγχους αυτόματης πιπέττας. Η αποικία μεταφέρεται σε κωνική φιάλη με 100 mL θρεπτικό μέσο LB που περιέχει αμπικικιλίνη και ακολουθεί επώαση για 12-16 h στις 250 rpm στους 37°C. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται το κατάλληλο κιτ απομόνωσης πλασμιδιακού DNA της QIAGEN. Το πλασμιδιακό DNA λαμβάνεται σύμφωνα με τις ακριβείς οδηγίες του πρωτοκόλλου, το οποίο στο τελικό στάδιο κατακρημνίζεται με 0.7 όγκους ισοπροπανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 rpm, στους 4°C, για 90 min, αφαίρεση υπερκευμένου, καθαρισμός με 0.7 όγκους 70% αιθανόλης, φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 25 min, αφαίρεση υπερκευμένου, ξήρανση στους 56°C για 15 min, και παραλαβή του ιζήματος. Τέλος, ακολουθεί διαλυτοποίηση σε 350 µL αποστειρωμένου ddH₂O, και αποθήκευση στους -20°C.

2.9.3. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας πλασμιδιακού και γενωμικού DNA

2.9.3.1. Υλικά

- Απομονωμένα πλασμιδιακά DNA
- ddH₂O
- Nanodrop™, ThermoFisher Scientific

2.9.3.2. Μέθοδος

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA μετράται η απορρόφησή του στα 260 nm, A_{260} , σε φθορισμόμετρο σταγόνας Nanodrop. Η καθαρότητα του DNA καθορίζεται από το λόγο των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260 nm και στα 280 nm, δηλαδή A_{260}/A_{280} . Οι ενδεικτικές τιμές του λόγου A_{260}/A_{280} για καθαρό DNA διαλυτοποιημένο σε νερό κυμαίνονται μεταξύ 1.8 και 2.0. Χαμηλότερες τιμές υποδηλώνουν την παρουσία επιπλέον συστατικών-μολυντών, όπως πρωτεΐνες, ενώ υψηλότερες υποδηλώνουν αποσύνθεση του DNA. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και καθαρότητας τους εκάστοτε DNA, χρησιμοποιείται 1 μ L αυτό, αφού προηγουμένως το μηχάνημα «διαβάσει» το ddH₂O ως τυφλό προς σύγκριση.

2.9.4. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας πλασμιδιακού και γενωμικού DNA

2.9.4.1. Υλικά

- Απομονωμένα πλασμιδιακά DNA
- Περιοριστικά ένζυμα NotI, XbaI, BamHI, New England Biolabs (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)
- Ρυθμιστικό διάλυμα NEB buffer 3.1, New England Biolabs (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)

2.9.4.2. Μέθοδος

Για την επιβεβαίωση της απομόνωσης του επιθυμητού πλασμιδιακού φορέα, καθώς και ποιοτική εκτίμηση της ποσότητας αυτού, λαμβάνει χώρα πέψη του πλασμιδιακού DNA και ηλεκτροφόριση αγαρόζης του προϊόντος πέψης. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη πέψη κάθε φορέα επιλέγονται μετά από μελέτη του πλασμιδιακού τους χάρτη και συγκεκριμένα των θέσεων περιορισμού που φέρουν. Τα περιοριστικά ένζυμα των φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία παραθέτονται στον Πίνακα 1.

| Πλασμιδιακός φορέας | Ένθεμα | Φθορίζουσα πρωτεΐνη | Γονίδιο ανθεκτικότητας επιλογής βακτηριακών κυττάρων | Περιοριστικά ένζυμα | Προϊόντα πέψης |
|---------------------------------|-----------|---------------------|--|---------------------|----------------|
| pWPIR-eGFP | Scrambled | GFP | αμπικιλίνη | BamHI-NotI | ~1300 |
| pWPIR-hTRF2dBdC-eGFP (11298 nt) | hTRF2 | GFP | αμπικιλίνη | BamHI-NotI | ~3000 |
| pWPIR-hTRF2WT-eGFP (11598 nt) | hTRF2WT | GFP | αμπικιλίνη | BamHI-NotI | ~3000 |

Πίνακας 1: Πληροφορίες πλασμιδίων και διαδικασιών που συμπεριλαμβάνονται στην παραγωγή τους.

Σε erpendorfs εισάγονται 5-10 μ L πλασμιδιακού DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα αυτών, όπως υποδεικνύονται από τον κατασκευαστή, σε συγκέντρωση 1x. Κατόπιν ανάμιξης, τα μίγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 h 15 min.

2.9.5. Ταυτοποίηση πλασμιδιακού DNA μέσω ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού

2.9.5.1. Υλικά

- TBE (Tris-Borate-EDTA, Sigma) 0.5x
- Αγαρόζη, Sigma
- Χρωστική φόρτωσης δειγμάτων 6x, New England Biolabs
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0.001% αραιωμένο σε ddH₂O, Sigma
- Δείκτης μοριακών βαρών 1 kb, NEB

2.9.5.2. Μέθοδος

Τα προϊόντα πέψης του πλασμιδιακού DNA, όντας γραμμικά, μεταναστεύουν σε πήκτωμα αγαρόζης με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η πυκνότητα του πηκτώματος και η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού καθορίζονται ανάλογα με τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, διαλύοντας 1 g σκόνης αγαρόζης σε 100 mL 0.5x TBE. Κατά τη παρασκευή του πηκτώματος προστίθεται 0.001% βρωμιούχο αιθίδιο (1 μL). Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθεται σε αυτά διάλυμα χρώσης το οποίο είναι καθορισμένου μοριακού βάρους και δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της ηλεκτροφόρησης. Αυτά φορτώνονται στο πήκτωμα αγαρόζης, μαζί με το δείκτη μοριακών βαρών, το οποίο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TBE 0.5x), και ηλεκτροφορούνται για 30 min στα 130 V.

2.10. Παραγωγή lenti-ιού

2.10.1. Υλικά

- HEK293T κύτταρα (ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Α. Κλινάκη)
- Lipofectamine2000, ThermoFisher Scientific
- OptiMEM 1x, Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1x, Gibco
- Πλασμιδιακά DNA

2.10.2. Μέθοδος

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου που συνοδεύει τη Lipofectamine2000. Για την παραγωγή lenti-ιού αξιοποιήθηκαν τα τρία πλασμίδια που απομονώθηκαν στην παράγραφο 2.7.2, και οι φορείς πλασμιδίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

| Πλασμιδιακός φορέας | Ένθεμα | Φθορίζουσα πρωτεΐνη | Είδος | Γενιά | Γονίδιο ανθεκτικότητας επιλογής βακτηριακών κυττάρων |
|---------------------------------|-----------|---------------------|------------------|----------------|--|
| ρWPIR-eGFP | Scrambled | GFP | πλασμίδιο-στόχος | - | αμπικικιλίνη |
| ρWPIR-hTRF2dBdC-eGFP (11298 nt) | hTRF2 | GFP | πλασμίδιο-στόχος | - | αμπικικιλίνη |
| ρWPIR-hTRF2WT-eGFP (11598 nt) | hTRF2WT | GFP | πλασμίδιο-στόχος | - | αμπικικιλίνη |
| ρMD2.G (5824 bp) | VSV G | - | envelope | 2 ^η | αμπικικιλίνη |
| ρsPAX2 (10703 bp) | - | - | packaging | 2 ^η | αμπικικιλίνη |

Πίνακας 2: Πληροφορίες πλασμιδίων και φορέων για την παραγωγή lenti-ιού.

Η εισαγωγή των πλασμιδίων με χρήση Lipofectamine2000 λαμβάνει χώρα στάγδην σε HEK293T κύτταρα με OptiMEM. Το θρεπτικό αντικαθίσταται από νέο θρεπτικό DMEM μετά το πέρας 5 h. Μετά το πέρας 24 h από την ανανέωση του θρεπτικού, ο ιός συλλέγεται με συλλογή του υπερκειμένου των κυττάρων, φυγοκέντρηση στις 1100 rpm, 4°C για 10 min, φιλτράρισμα υπερκειμένου από φίλτρο 0.45 μm. Το θρεπτικό των κυττάρων ανανεώνεται για επόμενη συλλογή στο πέρας του επόμενου 24-ώρου, δηλαδή στις 48 h. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια. Ο ιός που συλλέγεται χρησιμοποιείται απευθείας, είτε αποθηκεύεται

προσωρινά στους 4°C, διαφορετικά στους -20°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα αποθήκευσης.

2.11. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με lenti-ιό

2.11.1. Υλικά

- Lenti-ιοί που φέρουν τα επιθυμητά πλασμίδια
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1x, Gibco

2.11.2. Μέθοδος

Η διαμόλυνση των επιθυμητών κυττάρων λαμβάνει χώρα σε 6-well plates, στα οποία ευρίσκονται κύτταρα σε ποσοστό κάλυψης 60-70%. Σε αυτά ανανεώνεται το θρεπτικό με προσθήκη 1 mL DMEM. Ο ιός προστίθεται στάγδην κατά μήκος της επιφάνειας εκάστοτε πηγαδιού και τα κύτταρα επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα στον επωαστικό κλίβανο. Η επιτυχία της διαμόλυνσης ελέγχεται σε ορθό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss, με εξέταση της έντασης και του ποσοστού έκφρασης της GFP επί του ποσοστού του συνολικού αριθμού των κυττάρων.

2.12 Μέθοδος C-Circle

Η μέθοδος βασίζεται στον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των κυκλικών εξωχρωσωστικών C-κύκλων, χαρακτηριστικών του μηχανισμού ALT, με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης, και την εν συνεχεία ανίχνευσή τους με PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Η εκλεκτική ενίσχυσή τους επιτυγχάνεται με τη χρήση της πολυμεράσης φ29 και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου του Roger R. Reddel (Lau *et al.*, 2013).

Συγκεκριμένα, απομονώνεται το DNA από τις επιθυμητές καλλιέργειες με χρήση κατάλληλου κιτ της QIAGEN. Ακολουθεί εκλεκτική ενίσχυση των προϊόντων C-circles με τη χρήση της φ29 πολυμεράσης και κατόπιν, RT-PCR για την ανίχνευση των προϊόντων αυτών με τη χρήση τελομερικών εκκινητών. Πραγματοποιείται αντίστοιχη

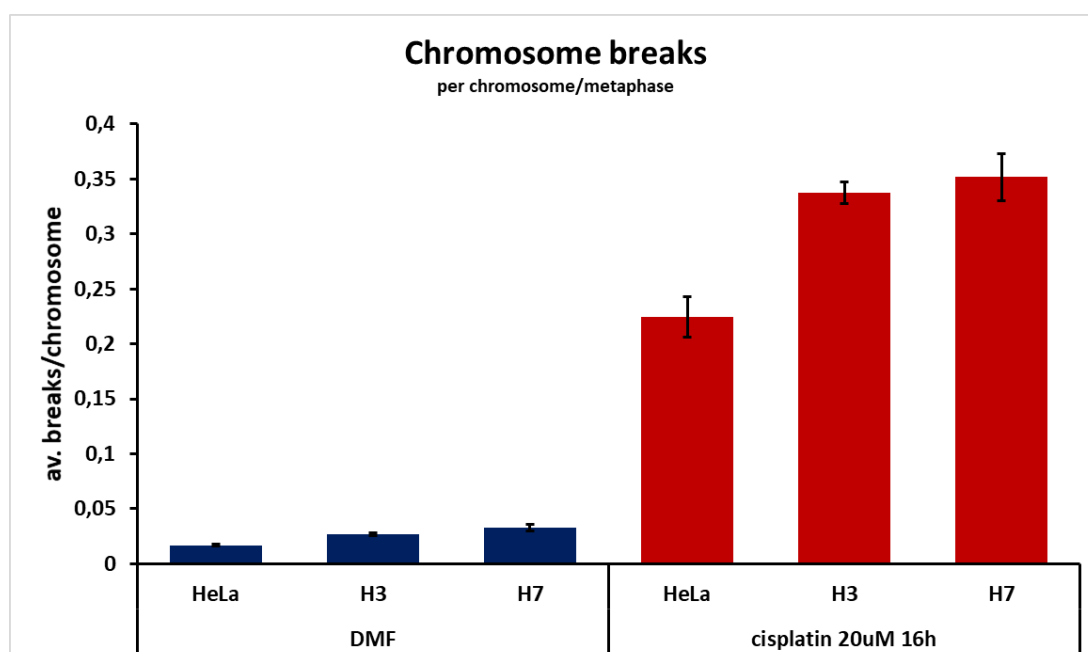
RT-PCR με τη χρήση ανιχνευτών για το γονίδιο που βρίσκεται σε μονό αντίγραφο (single-copy gene), προς κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στην περίπτωση των τελομερικών εκκινήτων. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με χρήση του προγράμματος Microsoft Excel, σύμφωνα με το ακριβές πρωτόκολλο C-circle assay (Lau *et al.*, 2013).

Αποτελέσματα

3.1. Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase⁺ κύτταρα

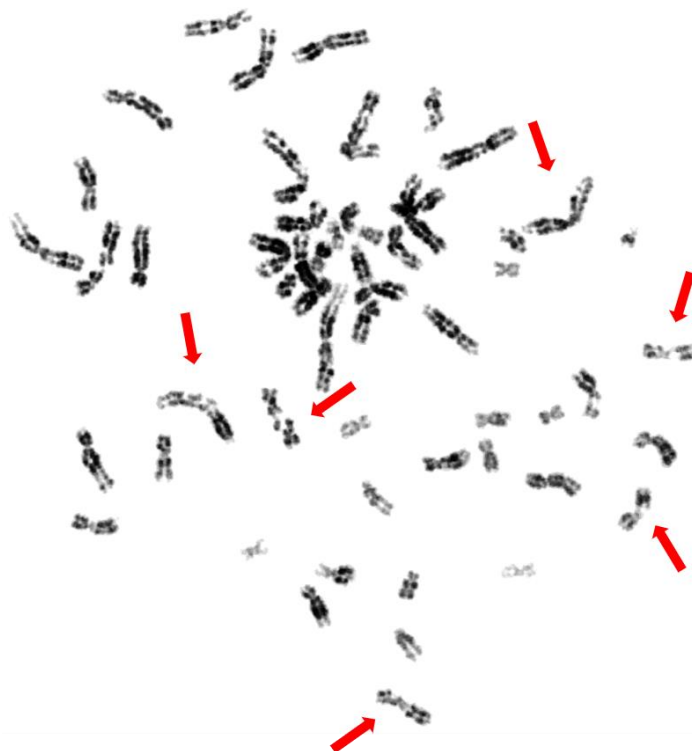
Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa (wild-type, WT), H3 και H7. Με χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 δημιουργήθηκαν δύο κλώνοι της κυτταρικής σειράς HeLa, οι H3 και H7, ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του συνεργάτη μας, Dr Wojciech Niedzwiedz.

Στις καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων, εισήχθει ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας cisplatin σε συγκέντρωση 20 μ M για 16 h, ο οποίος προκαλεί βλάβες στο DNA, ενώ στην ομάδα μάρτυρα (control) εισήχθει ο διαλύτης DMF. Μετά το πέρας των 16 h, παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα και έγινε προσθήκη DAPI-Vectashield. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των θραύσεων αυτών σε 25 διαφορετικές μεταφάσεις, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase⁺ κύτταρα. Χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα cisplatin σε συγκέντρωση 20 μ M για 16 h, οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού των θραύσεων των χρωμοσωμάτων, σε

κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2 (κλώνοι H3, H7) σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα HeLa, καθώς και σε σχέση με την ομάδα control που έλαβε τον διαλύτη της cisplatin.



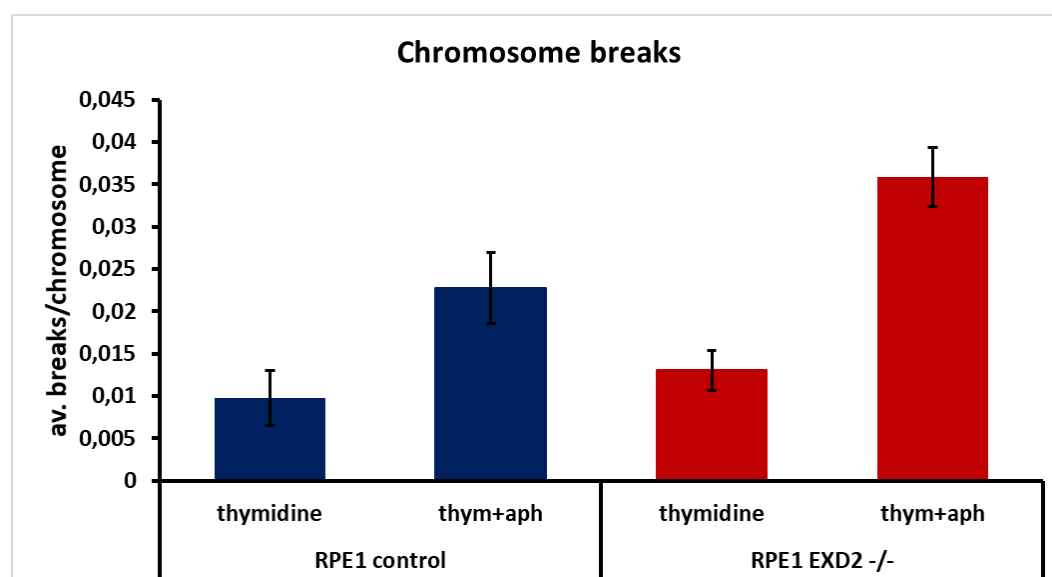
Σχήμα 17: Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase+ κύτταρα. Χαρακτηριστική φωτογραφία στην οποία διακρίνονται οι θραύσεις των χρωμοσωμάτων στον κλώνο H7 (κόκκινα βέλη), από τον οποίο απουσιάζει η EXD2, έπειτα από τη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα cisplatin σε συγκέντρωση 20 μM για 16 h. 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

Παρατηρείται ότι χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα cisplatin σε συγκέντρωση 20 μM για 16 h, οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού των θραύσεων των χρωμοσωμάτων, σε κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2 (κλώνοι H3, H7) σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα HeLa, καθώς και σε σχέση με την ομάδα control που έλαβε μόνο τον διαλύτη της cisplatin. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα. Με χρήση των προγραμμάτων Microsoft Excel και GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test και Mann–Whitney U test, αποδεικνύεται ότι οι παραπάνω διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με $p < 0.04$.

3.2. Η EXD2 προστατεύει αθανатоποιήμενα κύτταρα από τις χρωμοσωμικές βλάβες

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα αθανατοποιημένα με hTERT κύτταρα RPE1 (wild-type) και RPE1 EXD2 $-/-$. Τα EXD2 knockout κύτταρα δημιουργήθηκαν με χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στην κυτταρική σειρά RPE1, ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του συνεργάτη μας, Dr Wojciech Niedzwiedz.

Στις καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων, εισήχθει thymidine για 16 h προς συγχρονισμό των κυττάρων, η οποία μετά το πέρας αυτών εκπλύθηκε με χρήση PBS 1x, και τα κύτταρα αφέθηκαν σε καλλιέργεια για ακόμη 12 h. Στην ομάδα που δεν αποτελεί control προστέθηκε aphidicolin -η οποία προκαλεί στρες αντιγραφής- σε συγκέντρωση 0.4 μ M 6 h πριν από τη λήξη του 12-ώρου. Μετά το πέρας των 12 h, παρελήφθησαν τα μεταφασικά χρωμοσώματα και έγινε προσθήκη DAPI-Vectashield. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των θραύσεων αυτών σε 25 διαφορετικές μεταφάσεις, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 18.



Σχήμα 18: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 προστατεύει αθανατοποιήμενα κύτταρα από τις χρωμοσωμικές βλάβες. Αρχικά τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 16 h με χορήγηση thymidine,

ακολουθούμενη από εκπλύσεις και καλλιέργεια στις συνήθεις συνθήκες για 12 h (release). Στην non-control ομάδα προστέθηκε arhidicolin που προκαλεί στρες αντιγραφής σε συγκέντρωση 0.4 μM 6 h πριν από τη λήξη του 12-ώρου. Η χορήγηση της arhidicolin καθ'αυτής οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των θραύσεων των χρωμοσωμάτων στην ομάδα control, αλλά σε ακόμη πιο σημαντική αύξηση στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2 (RPE1 EXD2 -/-).



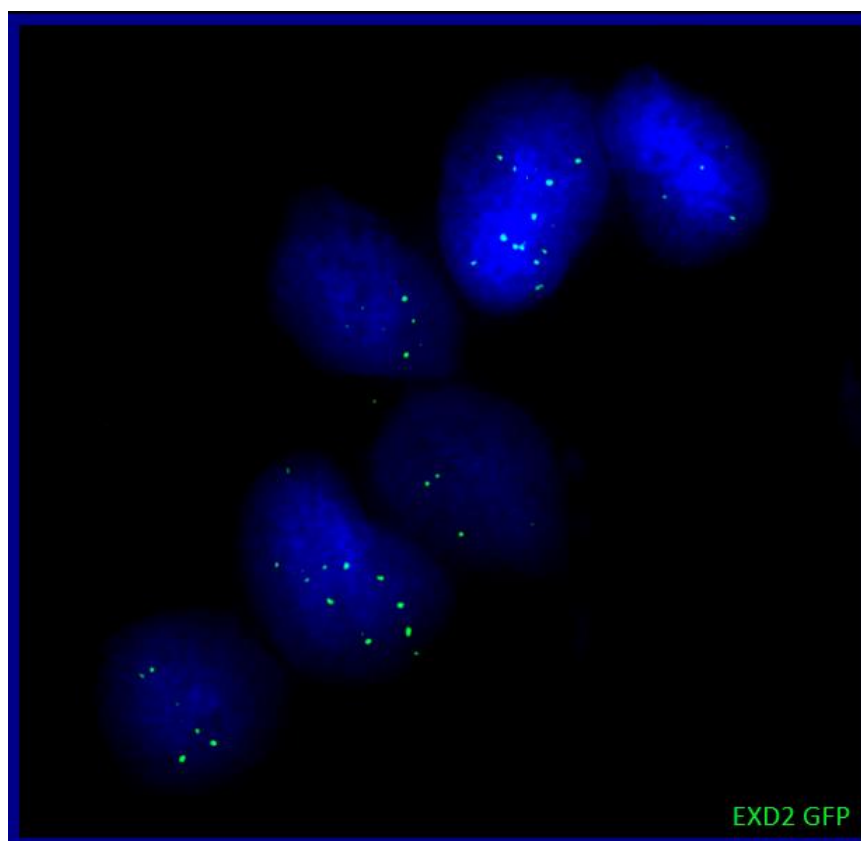
Σχήμα 19: Η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε σε αθανатоποιημένα κύτταρα. Χαρακτηριστική φωτογραφία στην οποία διακρίνονται οι θραύσεις των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα RPE1 EXD2 -/- (κόκκινα βέλη), έπειτα από συγχρονισμό των κυττάρων, και χορήγηση arhidicolin σε συγκέντρωση 0.4 μM για 6 h, προς δημιουργία στρες αντιγραφής. 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

Παρατηρείται ότι χορήγηση της arhidicolin καθ'αυτής οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των θραύσεων των χρωμοσωμάτων στην ομάδα control, αλλά σε ακόμη πιο σημαντική αύξηση στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2 (RPE1 EXD2 -/-). Με χρήση των προγραμμάτων Microsoft Excel και GraphPad, αποδεικνύεται ότι οι παραπάνω διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές.

3.3. Η EXD2 σχηματίζει πυρηνικά κοκκία στα ALT κύτταρα

Για την πραγματοποίηση του παρόντος πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα οστεροσαρκώματος U2OS, κατεχοχόν και ευρέως χρησιμοποιούμενη ALT κυτταρική σειρά. Πέραν των U2OS WT (wild-type), χρησιμοποιήθηκε U2OS κλώνος, στον οποίο υπερεκφράζεται η EXD2 όντας συζευγμένη με GFP (U2OS EXD2-GFP-overexpressing), ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του συνεργάτη μας, Dr Wojciech Niedzwiedz.

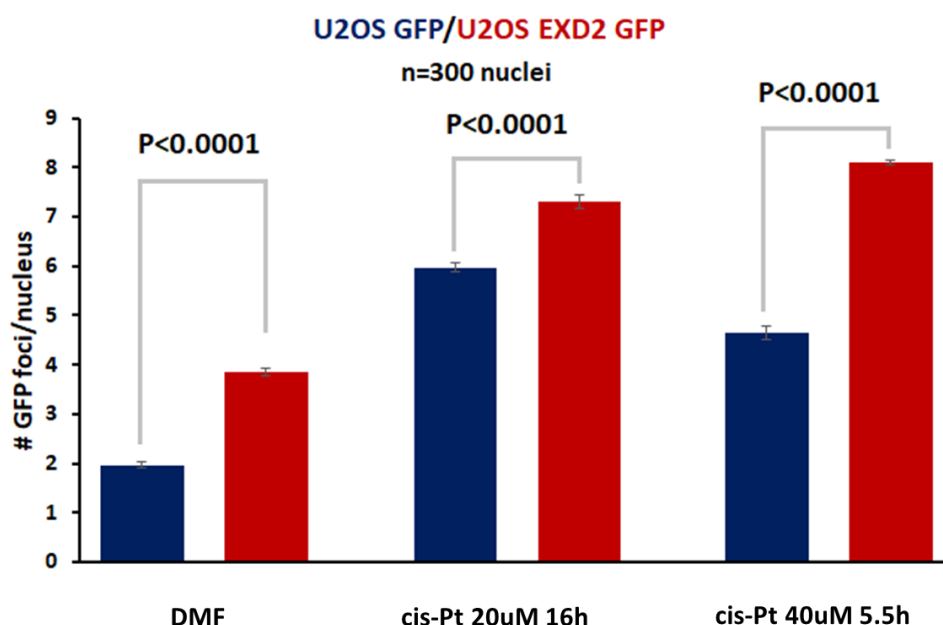
Με ανοσοφθορισμό και χρήση αντισώματος έναντι της GFP (mouse anti-GFP, 1:100, Roche), παρατηρείται ο σχηματισμός διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 στους πυρήνες των ALT κυττάρων (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Η EXD2 σχηματίζει διακριτά πυρηνικά κοκκία στα ALT κύτταρα. Χαρακτηριστική φωτογραφία στην οποία διακρίνονται τα διακριτά πυρηνικά κοκκία της EXD2 (πράσινο) στους πυρήνες U2OS EXD2-GFP-overexpressing κυττάρων. DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

3.4. Τα πυρηνικά κοκκία της EXD2 στα ALT κύτταρα είναι εξαρτώμενα από τη βλάβη στο DNA

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2-GFP-overexpressing κύτταρα. Στις καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων, εισήχθει ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας cisplatin ο οποίος προκαλεί βλάβες στο DNA, σε συγκεντρώσεις 20 μ M για 16 h και 40 μ M για 5 h 30 min, αντιστοίχως, ενώ στην ομάδα control εισήχθη για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα ο διαλύτης DMF. Μετά το πέρας των εκάστοτε ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της GFP (mouse anti-GFP, 1:100, Roche). Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 σε 100 κύτταρα, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 21.



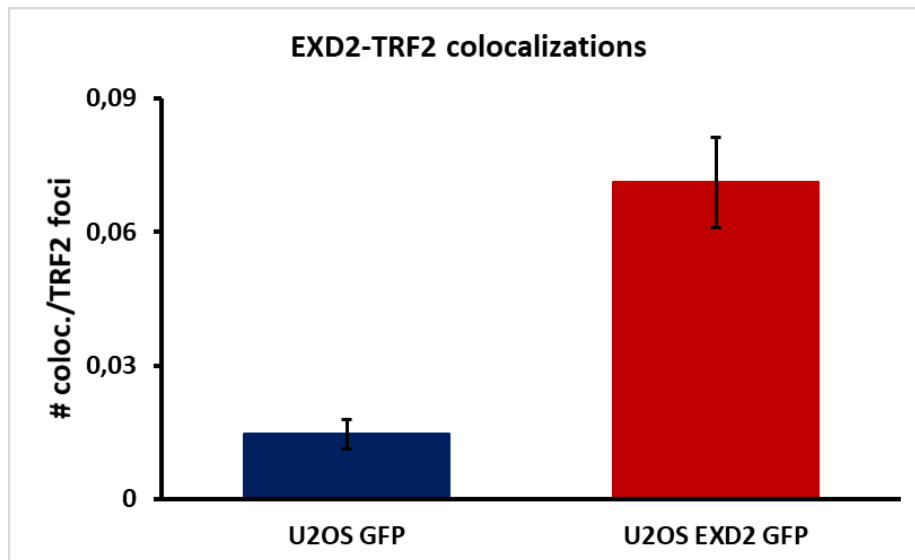
Σχήμα 21: Τα πυρηνικά κοκκία της EXD2 στα ALT κύτταρα είναι εξαρτώμενα από τη βλάβη στο DNA. Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα cisplatin ο οποίος προκαλεί βλάβες στο DNA, σε

συγκεντρώσεις 20 μM για 16 h και 40 μM για 5 h 30 min, αντιστοίχως, προκαλεί σημαντική αύξηση στον αριθμό των διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2, σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία η έκφρασή της είναι η φυσιολογική. Στην ομάδα control εισήχθη για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα ο διαλύτης DMF.

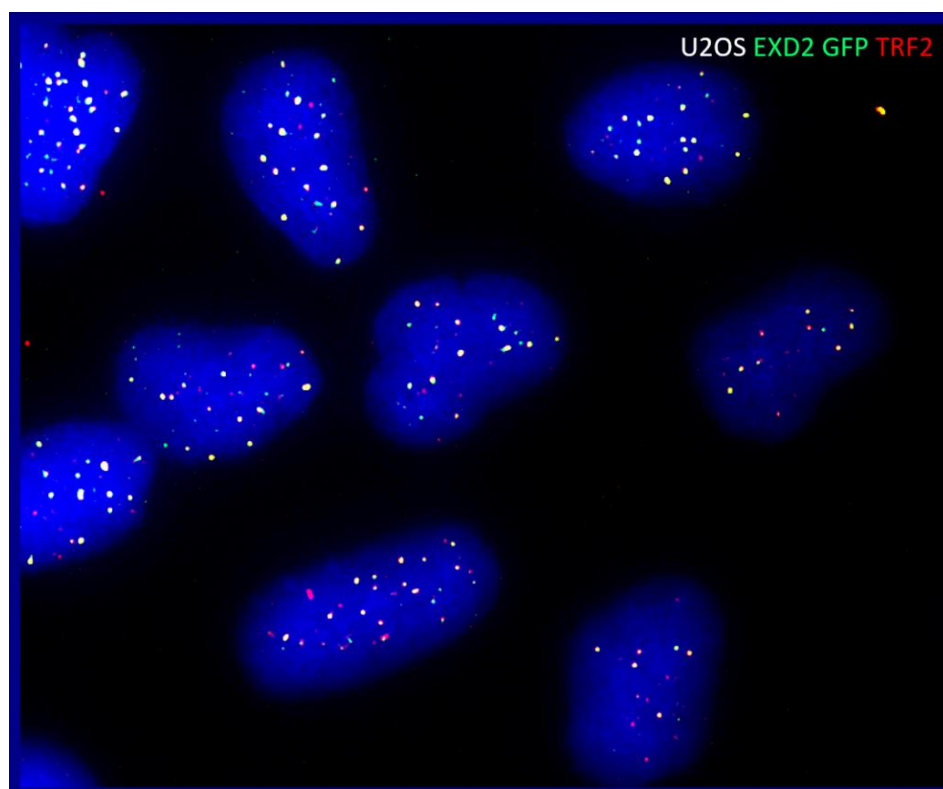
Παρατηρείται ο σχηματισμός διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 στους πυρήνες των ALT κυττάρων, των οποίων ο αριθμός αυξάνεται στην περίπτωση των κυττάρων που υπερεκφράζουν την EXD2 (control περίπτωση με DMF). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αύξηση στον αριθμό αυτών παρουσία του χημειοθεραπευτικού παράγοντα που προκαλεί βλάβες στο DNA, cisplatin, και στις δύο συγκεντρώσεις (20 μM για 16 h και 40 μM για 5 h 30 min). Παρατηρείται επίσης, ότι η χορήγηση διπλάσιας συγκέντρωσης cisplatin (40 μM) για πολύ λιγότερες ώρες (5 h 30 min), προκαλεί σημαντικότερη αύξηση του αριθμού των διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα. Με χρήση των προγραμμάτων Microsoft Excel και GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test και Mann–Whitney U test, αποδεικνύεται ότι οι παραπάνω διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με $p < 0.0001$.

3.5. Η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2-GFP-overexpressing κύτταρα (ποιοτική και ποσοτική μέτρηση), καθώς και δύο κλώνοι κυττάρων U2OS που υπερεκφράζουν την EXD2 συζευγμένη με FLAG, U2OS FLAG-HA-EXD2 WT cl.10 και cl.13 (ποιοτική σύγκριση). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι GFP (mouse anti-GFP, 1:100, Roche), TRF2 (rabbit anti-TRF2, 1:500, Santa Cruz Biotechnology), και FLAG (mouse anti-FLAG, 1:100, Sigma). Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των συνεντοπισμών των πυρηνικών κοκκίων EXD2 και TRF2 σε 100 κύτταρα, και αναπαρίσταται στο Σχήμα 22.

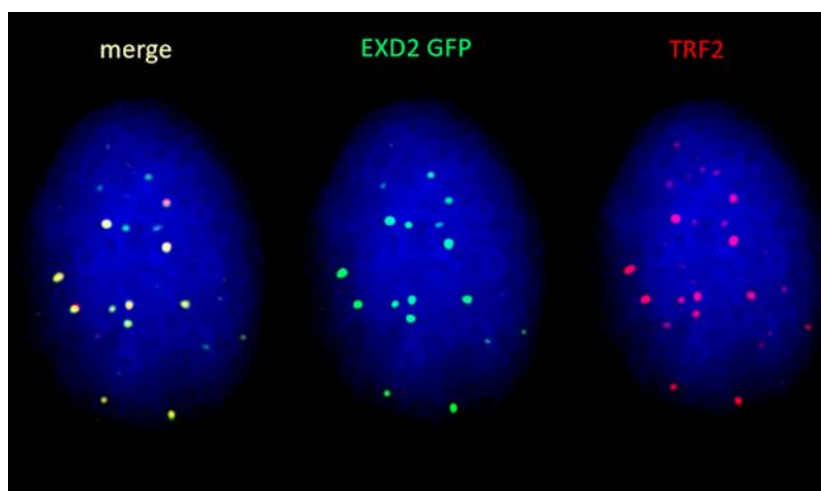


Σχήμα 22: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται η συχνότητα συνεντοπισμών της EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα. Υπερέκφραση της EXD2 οδηγεί σε αύξηση των συνεντοπισμών των πυρηνικών της κοκκίων με την TRF2, η οποία είναι ανεξάρτητη από το πλήθος των πυρηνικών κοκκίων TRF2 σε εκάστοτε πυρήνα.

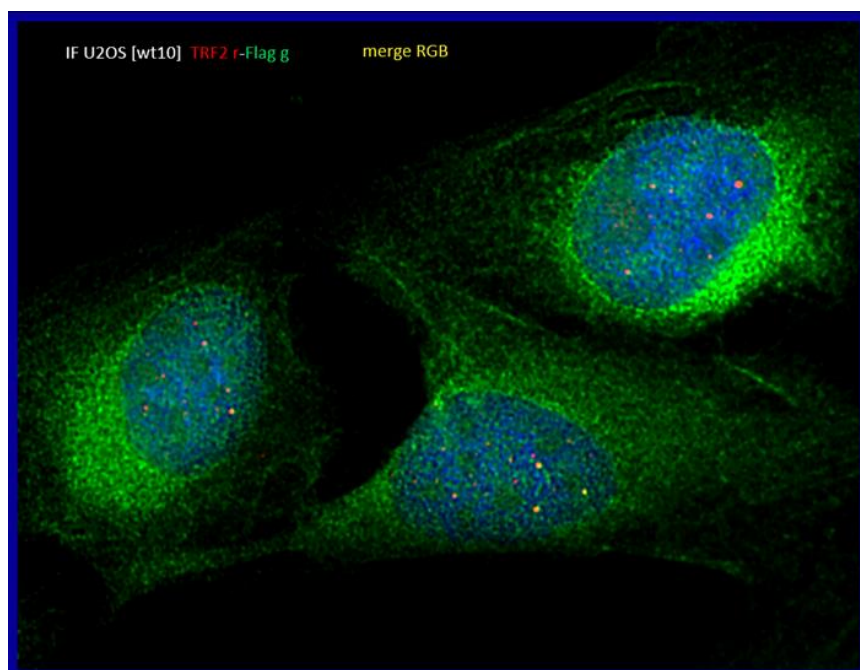


Σχήμα 23: Η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία των U2OS EXD2-GFP-overexpressing κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες

EXD2 (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

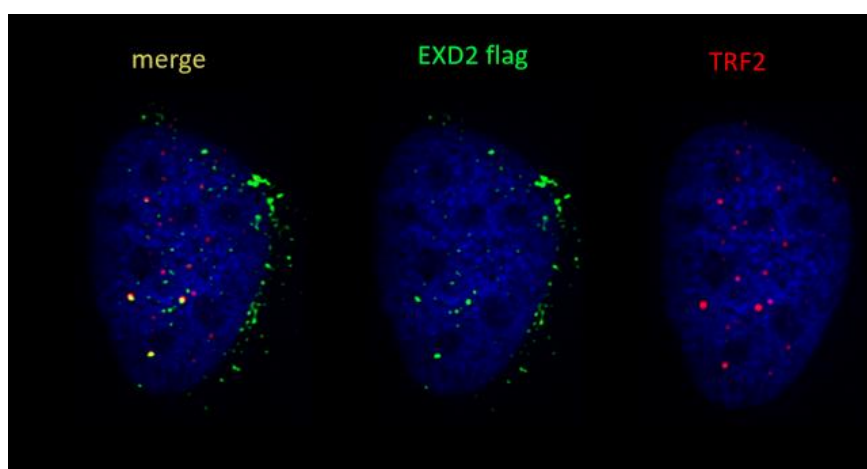


Σχήμα 24: Μεγέθυνση της φωτογραφίας του σχήματος 22. Η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα. Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS EXD2-GFP-overexpressing κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες EXD2 (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.



Σχήμα 25: Επιβεβαίωση των συνεντοπισμών της EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα. Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS FLAG-HA-WT cl.10-overexpressing κυττάρων, στην οποία

διαφαίνονται οι πρωτεΐνες EXD2 (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.



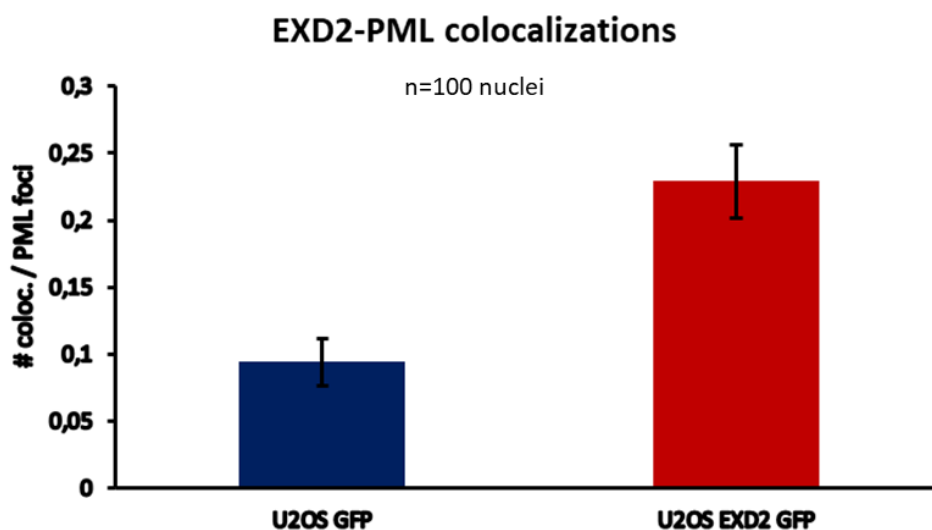
Σχήμα 26: Μεγέθυνση της φωτογραφίας του σχήματος 24. Η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TRF2 στα ALT κύτταρα. Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS FLAG-HA-WT cl.10-overexpressing κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες EXD2 (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρείται ο σχηματισμός διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 τα οποία συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη TRF2 στους πυρήνες των ALT κυττάρων. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης EXD2 και στις δύο κυτταρικές σειρές, οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των συνεντοπισμών της με την TRF2, η οποία είναι ανεξάρτητη από το πλήθος των πυρηνικών κοκκίων TRF2 σε εκάστοτε πυρήνα.

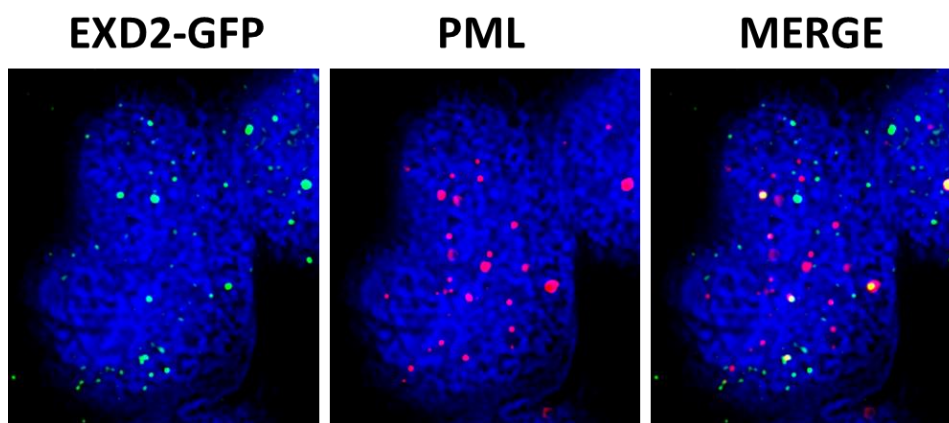
3.6. Η EXD2 αποτελεί μέρος των συσχετιζόμενων με τον ALT σωμάτων PML, APBs

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2-GPF-overexpressing κύτταρα. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της GFP (mouse anti-GFP, 1:100, Roche) και της PML (mouse anti-PML, 1:100, Santa Cruz Biotechnology). Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του

αριθμού των συνεντοπισμών των πυρηνικών κοκκίων EXD2 και PML σε 100 κύτταρα, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 27.



Σχήμα 27: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 αποτελεί μέρος των συσχετιζόμενων με τον ALT σωμάτων PML, APBs. Υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών της με την PML, η οποία είναι ανεξάρτητη από το πλήθος των πυρηνικών κοκκίων PML σε εκάστοτε πυρήνα.



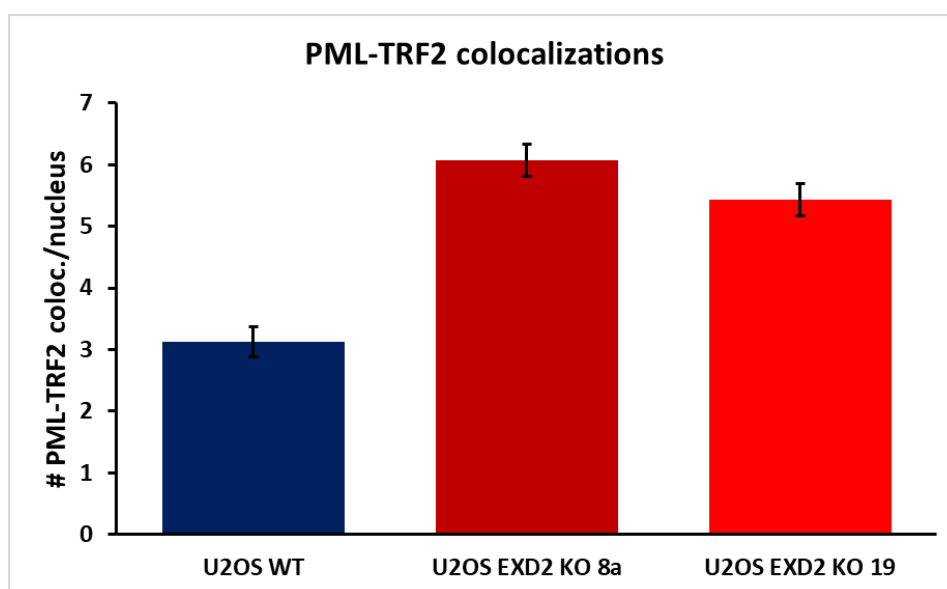
Σχήμα 28: Πυρήνας στον οποίο διακρίνεται ότι η EXD2 αποτελεί μέρος των συσχετιζόμενων με τον ALT σωμάτων PML, APBs. Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS EXD2-GFP-overexpressing κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες EXD2 (πράσινο), PML (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

Παρατηρείται ο σχηματισμός διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 τα οποία συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη PML στους πυρήνες των ALT κυττάρων.

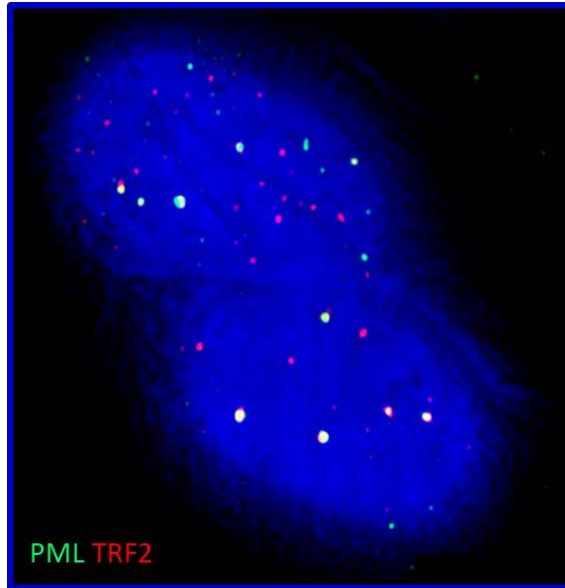
Υπερέκφραση της πρωτεΐνης EXD2 οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των συνεντοπισμών της με την PML, η οποία είναι ανεξάρτητη από το πλήθος των πυρηνικών κοκκίων PML σε εκάστοτε πυρήνα.

3.7. Η EXD2 αναστέλλει τη βιογένεση των APBs

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8a και cl.19. Με χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 δημιουργήθηκαν οι δύο παραπάνω κλώνοι της κυτταρικής σειράς U2OS, από το εργαστήριο του συνεργάτη μας, Dr Wojciech Niedzwiedz. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της PML (mouse anti-PML, 1:100, Santa Cruz Biotechnology) και της TRF2 (rabbit anti-TRF2, 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των συνεντοπισμών των πυρηνικών κοκκίων PML και TRF2 σε 100 κύτταρα, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 29.



Σχήμα 29: Η EXD2 αναστέλλει τη βιογένεση των APBs. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 και στους δύο κλώνους προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών της PML με την TRF2.



Σχήμα 30: Πυρήνες στους οποίους διακρίνεται ότι η EXD2 αναστέλλει τη βιογένεση των APBs. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών της PML με την TRF2. Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS EXD2 KO κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες PML (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

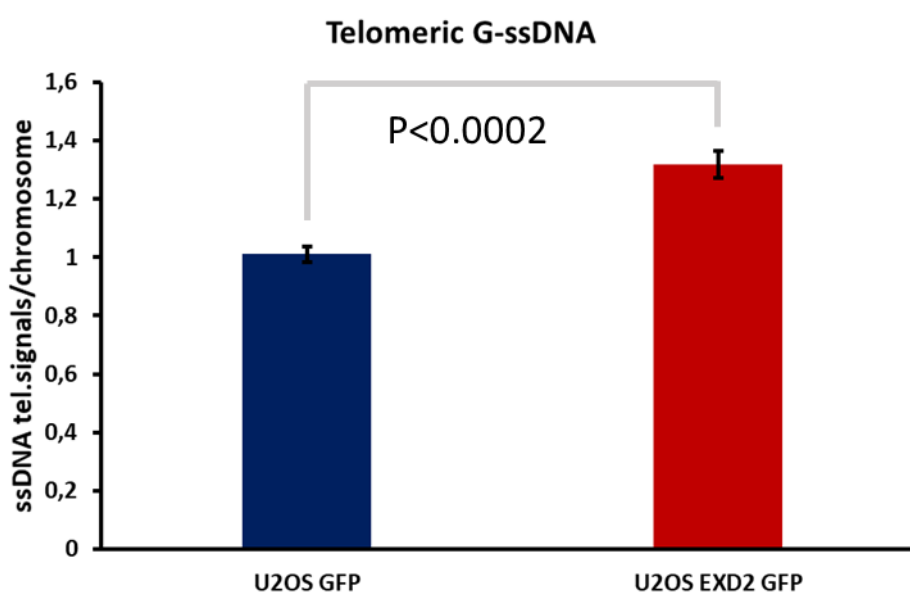
Παρατηρείται ο σχηματισμός διακριτών πυρηνικών κοκκίων της PML τα οποία συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη TRF2 στους πυρήνες των ALT κυττάρων. Απουσία της πρωτεΐνης EXD2 οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού των συνεντοπισμών της PML με την TRF2. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα. Με χρήση των προγραμμάτων Microsoft Excel και GraphPad, αποδεικνύεται ότι οι παραπάνω διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με $p < 0.0001$. Η στατιστική ανάλυση έλαβε χώρα με τη χρήση του προγράμματος GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test και Mann–Whitney U test.

3.8. Η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή

3.8.1. Η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στον G-κλώνο στα τελομερή

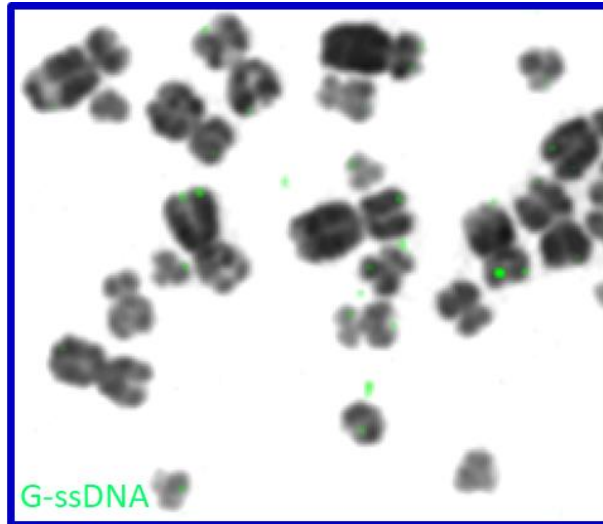
Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα U2OS και U2OS EXD2-GPF-overexpressing κύτταρα. Παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα στα οποία

εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο ND-FISH με τη βοήθεια της Χριστίνας Ραφτοπούλου, με χρήση PNA-ανιχνευτή που αναγνωρίζει τον μονόκλωνο G-κλώνο των τελομερών. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των τελομερικών σημάτων αυτών σε 25 διαφορετικές μεταφάσεις, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 31.



Σχήμα 31: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στον G-κλώνο στα τελομερή. Υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί σημαντική αύξηση των μονόκλωνων τελομερικών σημάτων.

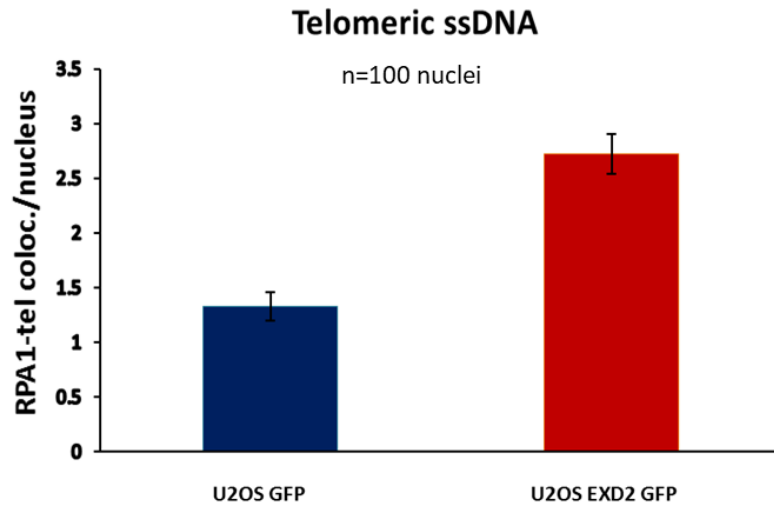
Παρατηρείται ότι υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί σημαντική αύξηση των μονόκλωνων τελομερικών σημάτων στον G-κλώνο στα τελομερή, αποδεικνύοντας ότι η EXD2 εμφανίζει δράση εξωνουκλεάσης σε αυτές τις περιοχές. Η στατιστική ανάλυση έλαβε χώρα με τη χρήση του προγράμματος GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test, δίνοντας αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό με $p < 0.0002$.



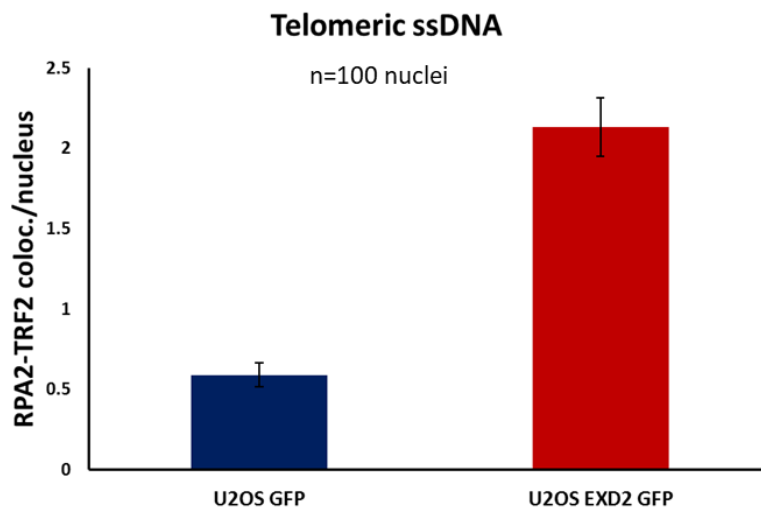
Σχήμα 32: Χρωμοσώματα μετάφασης στα οποία διακρίνεται ο μονόκλωνος G-κλώνος των τελομερών, κατόπιν σήμανσης με ειδικό PNA ανιχνευτή. Υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί σημαντική αύξηση των μονόκλωνων τελομερικών σημάτων (πράσινο). 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

3.8.2. Η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα U2OS και U2OS EXD2-GPF-overexpressing κύτταρα. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της RPA1 (mouse anti-RPA1, 1:20, Calbiochem), RPA2 (mouse anti-RPA2, 1:20, Calbiochem), και της TRF2 (rabbit anti-TRF2, 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Τα διαγράμματα κατασκευάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των συνεντοπισμών των πυρηνικών κοκκίων RPA1 και TRF2, και RPA2 και TRF2 σε 100 κύτταρα, η οποία αναπαρίσταται στα Σχήματα 33 και 34.

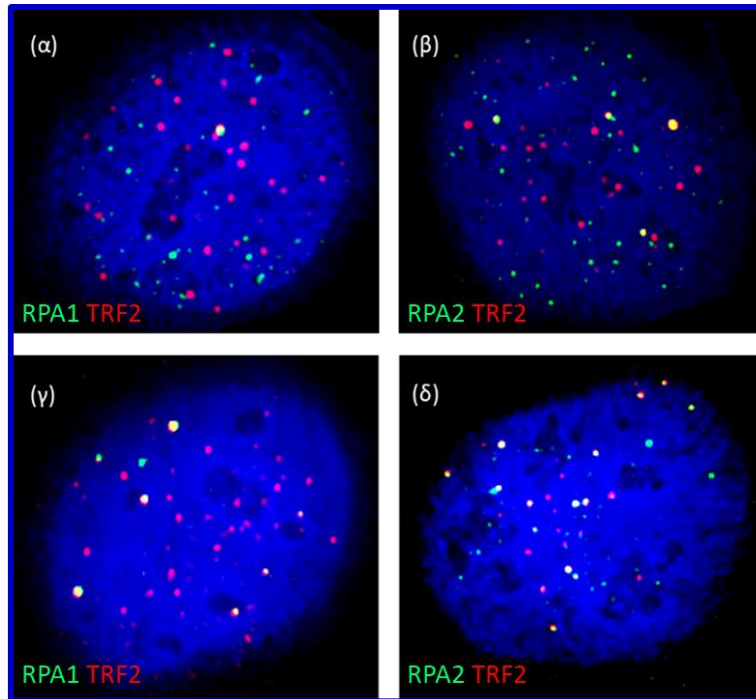


Σχήμα 33: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή. Υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών της RPA1 με την TRF2.



Σχήμα 34: Επιβεβαίωση της δράσης εξωνουκλεάσης της EXD2 στα τελομερή. Υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών της RPA2 με την TRF2.

Και στα δύο πειράματα, παρατηρείται ότι υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί σημαντική αύξηση των συνεντοπισμών της RPA1/RPA2 με την TRF2, αποδεικνύοντας ότι η EXD2 εμφανίζει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή.

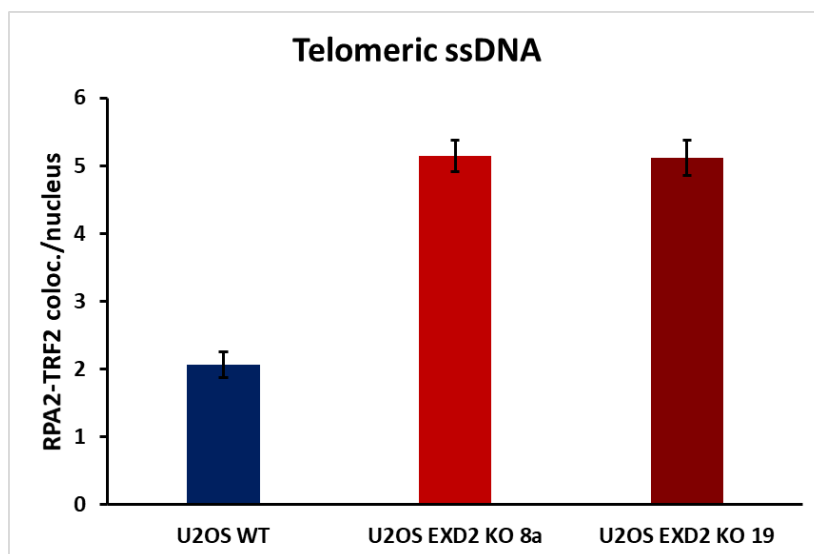


Σχήμα 35: Πυρήνες στους οποίους διακρίνονται οι συνεντοπισμοί RPA1/2 και τελομερικού DNA. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών των RPA1 και RPA2 με την TRF2. (α) U2OS WT κύτταρο στο οποίο διαφαίνονται οι πρωτεΐνες RPA1 (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). (β) U2OS WT κύτταρο στο οποίο διαφαίνονται οι πρωτεΐνες RPA2 και TRF2. (γ) Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS EXD2 KO κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες RPA1, TRF2, και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών. (δ) U2OS EXD2 KO κύτταρο στο οποίο διαφαίνονται οι πρωτεΐνες RPA2, TRF2 και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών. DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

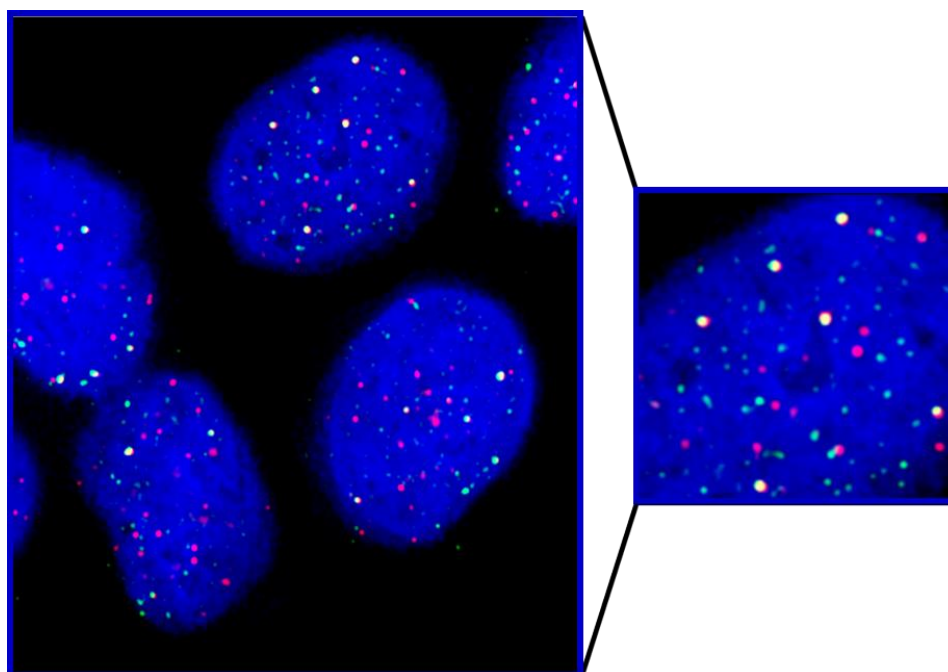
3.9. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 αυξάνει τα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA στα ALT κύτταρα

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8a και cl.19. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της RPA2 (mouse anti-RPA2, 1:20, Calbiochem) και της TRF2 (rabbit anti-TRF2, 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Τα διαγράμματα κατασκευάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των συνεντοπισμών των

πυρηνικών κοκκίων RPA2 και TRF2 σε 100 κύτταρα, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 36.



Σχήμα 36: Γράφημα στο οποίο αναπαρίσταται ότι η πλήρης αποσιώπηση της EXD2 αυξάνει τα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA στα ALT κύτταρα. Απουσία της EXD2, αυξάνεται σημαντικά ο αριθμός των συνεντοπισμών της πρωτεΐνης RPA2 με την TRF2.



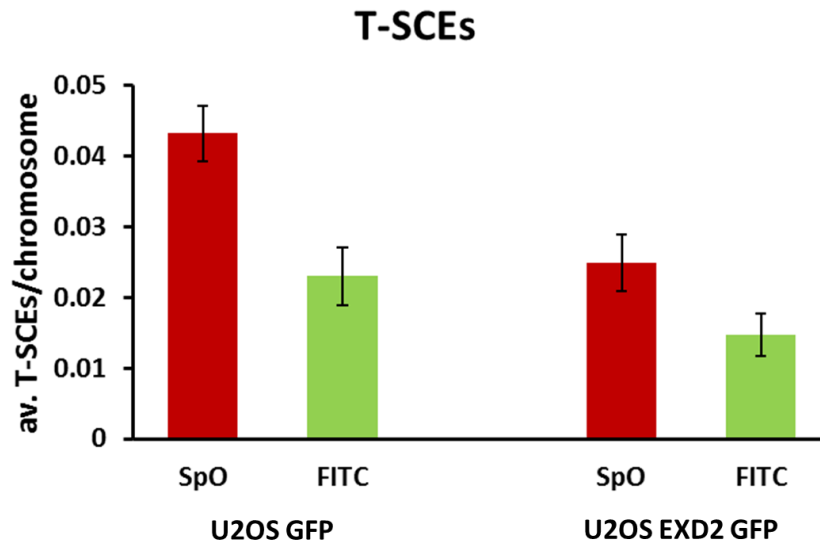
Σχήμα 37: Πυρήνες στους οποίους διακρίνονται τα αυξημένα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 προκαλεί αύξηση των συνεντοπισμών της RPA2 με την TRF2.

Χαρακτηριστική φωτογραφία των U2OS EXD2 KO κυττάρων, στην οποία διαφαίνονται οι πρωτεΐνες RPA2 (πράσινο), TRF2 (κόκκινο), και οι αυξημένοι συνεντοπισμοί αυτών (κίτρινο). DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

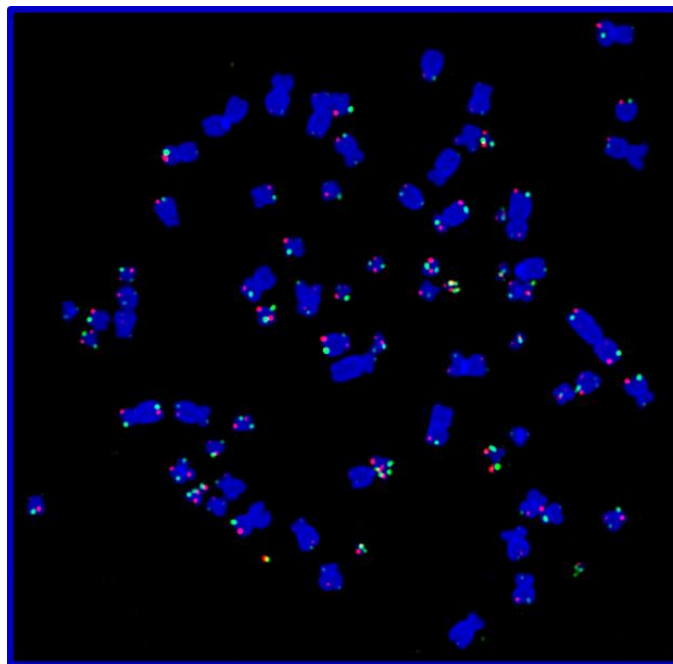
Παρατηρείται ότι απουσία της EXD2, αυξάνεται σημαντικά ο αριθμός των συνεντοπισμών της πρωτεΐνης RPA2 με την TRF2, και στους δύο κλώνους U2OS EXD2 KO, υποδηλώνοντας αυξημένα επίπεδα μονόκλωνου τελομερικού DNA.

3.10. Η υπερέκφραση της EXD2 καταστέλλει τον κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό c-HR στα τελομερή ALT κυττάρων

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα U2OS και U2OS EXD2-GPF-overexpressing κύτταρα. Μετά από χρήση BrdU/C για 16 h στις καλλιέργειες αυτών, παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα που είχαν περάσει έναν κύκλο αντιγραφής (one-round) παρουσία της BrdU/C, στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο CO-FISH, με χρήση PNA-ανιχνευτών που αναγνωρίζουν εκάστοτε κλώνο του τελομερούς. Με FITC (πράσινο) είναι σημασμένος ο C-κλώνος, ενώ με SpO (κόκκινο) ο G-κλώνος. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των τελομερικών σημάτων, χαρακτηριστικών των T-SCEs σε 25 διαφορετικές μεταφάσεις, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 38.



Σχήμα 38: Γράφημα στο οποίο διακρίνεται ότι η υπερέκφραση της EXD2 καταστέλλει το κλασικό μηχανισμό c-HR στα τελομερή ALT κυττάρων. Με FITC (πράσινο) είναι σημασμένος ο C-κλώνος, ενώ με SpO (κόκκινο) ο G-κλώνος. Υπερέκφραση της EXD2 ελαττώνει τον αριθμό των T-SCEs και στους δύο τελομερικούς κλώνους.



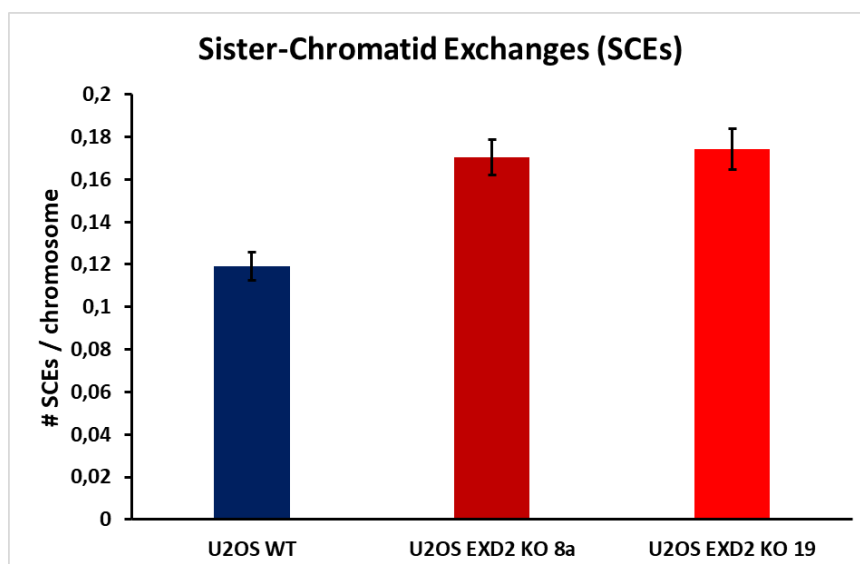
Σχήμα 39: Ενδεικτική φωτογραφία U2OS EXD2 GFP κυττάρων, έπειτα από πείραμα CO-FISH. Με FITC (πράσινο) είναι σημασμένος ο C-κλώνος, ενώ με SpO (κόκκινο) ο G-κλώνος. DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

Παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της EXD2 ελαττώνει τον αριθμό των T-SCEs που λαμβάνουν χώρα και στους δύο τελομερικούς κλώνους. Το αποτέλεσμα αυτό

επιβεβαιώνεται και με επανάληψη του πειράματος από τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

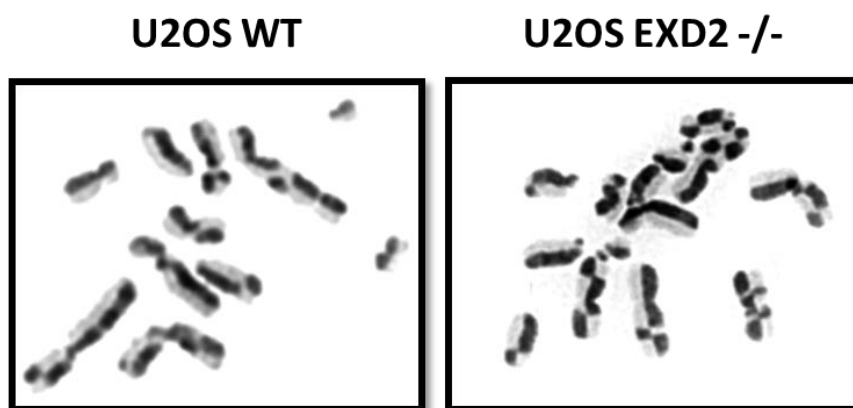
3.11. Η EXD2 καταστέλλει τον κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό c-HR στο γονιδίωμα των ALT κυττάρων

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8a και cl.19. Στις καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων, εισήχθει BrdU για 36 h. Επιπλέον, για τις ίδιες ώρες γίνεται ταυτόχρονη προσθήκη του παράγοντα mitomycin C τελικής συγκέντρωσης 20 ng/μL για την προαγωγή των SCEs (Duydu *et al.*, 2005). Μετά το πέρας των αυτών, παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα που είχαν περάσει δύο κύκλους αντιγραφής (two-round) παρουσία της BrdU, στα οποία έγινε προσθήκη DAPI-Vectashield. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των SCEs αυτών σε 25 διαφορετικές μεταφάσεις, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 40.



Σχήμα 40: Η EXD2 καταστέλλει τον κλασικό μηχανισμό c-HR στο γονιδίωμα των ALT κυττάρων. Πλήρης

αποσιώπηση της EXD2 προκαλεί αύξηση στις SCEs κατά μήκος των χρωμοσωμάτων κατόπιν χορήγησης του παράγοντα mitomycin C.



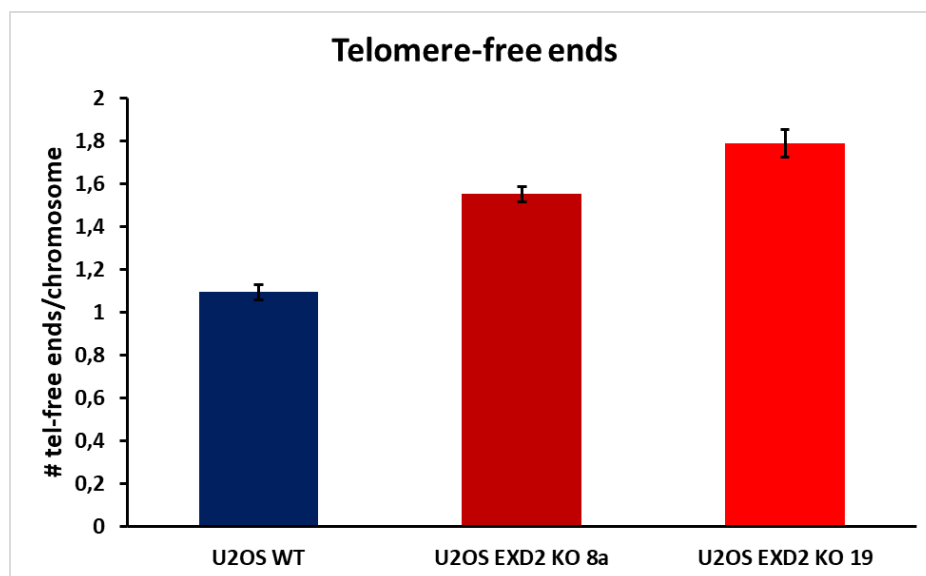
Σχήμα 41: Χαρακτηριστική εικόνα γενωμικών SCEs. Αριστερά διακρίνονται χρωμοσώματα U2OS WT κυττάρων κατόπιν χορήγησης του παράγοντα mitomycin, ενώ δεξιά U2OS EXD2 KO κύτταρα. Η EXD2 καταστέλλει τον κλασικό μηχανισμό c-HR στο γονιδίωμα των ALT κυττάρων, αφού πλήρης αποσιώπηση της EXD2 προκαλεί αύξηση των SCEs κατά μήκος των χρωμοσωμάτων κατόπιν χορήγησης του παράγοντα mitomycin C.

Παρατηρείται ότι απουσία της EXD2, εμφανίζεται αύξηση στις SCEs κατά μήκος των χρωμοσωμάτων στην περίπτωση χορήγησης του παράγοντα mitomycin C. Επομένως, διαφαίνεται ότι η EXD2 καταστέλλει τον κλασικό μηχανισμό c-HR στο γονιδίωμα των ALT κυττάρων.

3.12. Η απουσία της EXD2 αυξάνει τον αριθμό των ακάλυπτων τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων (telomere free ends)

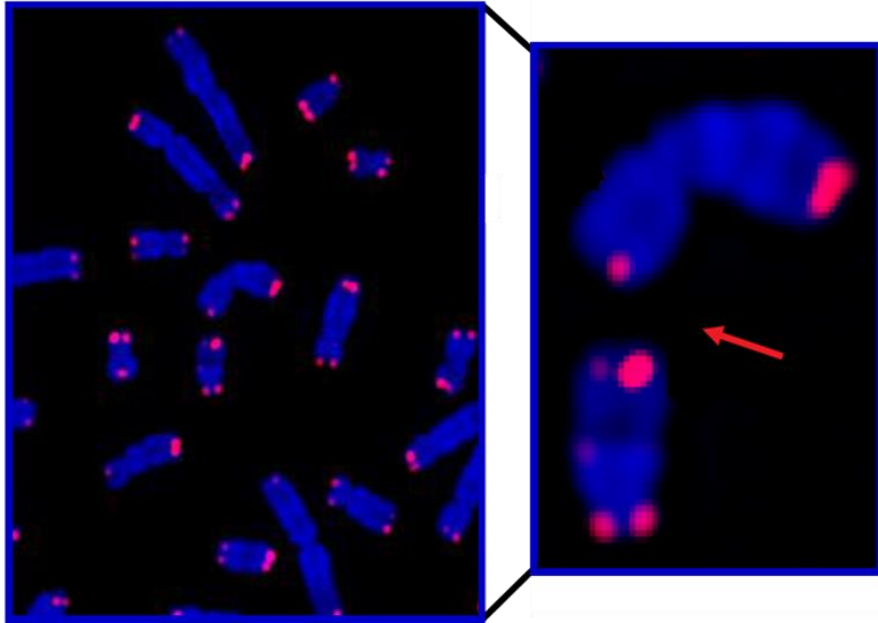
Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8a και cl.19. Παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο PNA-FISH, με χρήση PNA-ανιχνευτών που αναγνωρίζουν εκάστοτε κλώνο του τελομερούς. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα

μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των άνευ σημάτων τελομερών σε 5 διαφορετικές μεταφάσεις, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 42.



Σχήμα 42: Γράφημα στο οποίο διακρίνεται ότι η απουσία της EXD2 αυξάνει τον αριθμό των ακάλυπτων τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων (telomere free ends).

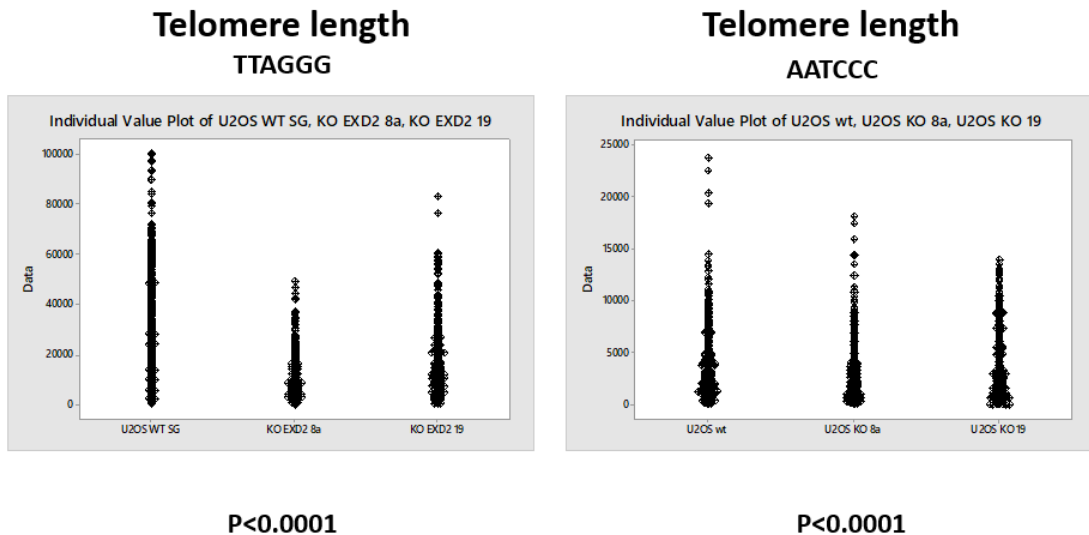
Παρατηρείται ότι απουσία της EXD2 αυξάνεται ο αριθμός των ακάλυπτων τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων (telomere free ends). Το παρόν αποτέλεσμα χρήζει επιβεβαίωσης καθώς για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των άνευ σημάτων τελομερών σε μικρό αριθμό διαφορετικών μεταφάσεων, και όχι σε 25 όπως στα υπόλοιπα πειράματα.



Σχήμα 43: Ενδεικτική φωτογραφία U2OS EXD2 KO κυττάρων στην οποία διακρίνονται τα ακάλυπτα τελομερικά άκρα των χρωμοσωμάτων (telomere free ends). Με SpO (κόκκινο) είναι σημασμένος ο G-κλώνος. DAPI: μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

3.13. Πλήρης αποσιώπηση της EXD2 ελαττώνει το μήκος των τελομερών στα κύτταρα ALT

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8a και cl.19. Παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο PNA-FISH, με χρήση PNA-ανιχνευτών που αναγνωρίζουν εκάστοτε κλώνο του τελομερούς. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1 και 63x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Η ποσοτικοποίηση της έντασης των σημάτων έγινε με χρήση του ίδιου προγράμματος. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση σε 15 διαφορετικές μεταφάσεις με τη βοήθεια της Δρ Χριστίνας Ραφτοπούλου, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 44.



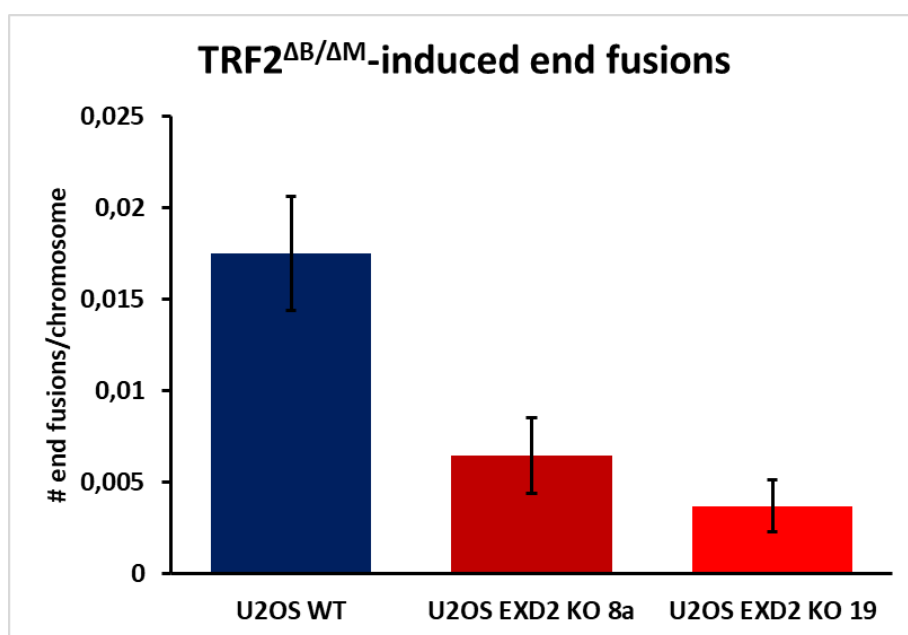
Σχήμα 44: Dotplot στο οποίο φαίνεται ότι η πλήρης αποσιώπηση της EXD2 ελαττώνει το μήκος των τελομερών στα κύτταρα ALT. Με χρήση PNA-ανιχνευτών που αναγνωρίζουν εκάστοτε κλώνο του τελομερούς (αριστερά: G-κλώνος, δεξιά: C-κλώνος), παρατηρείται ότι η απουσία της EXD2 προκαλεί σημαντική ελάττωση του τελομερικού μήκους στον G-κλώνο, και μικρή ελάττωση του τελομερικού μήκους στον C-κλώνο σε ALT κύτταρα.

Παρατηρείται ότι η απουσία της EXD2 προκαλεί σημαντική ελάττωση του τελομερικού μήκους στον G-κλώνο, και μικρή ελάττωση του τελομερικού μήκους στον C-κλώνο σε ALT κύτταρα. Η στατιστική ανάλυση έλαβε χώρα με τη χρήση του προγράμματος GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test και Mann–Whitney U test, ενώ το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Minitab.

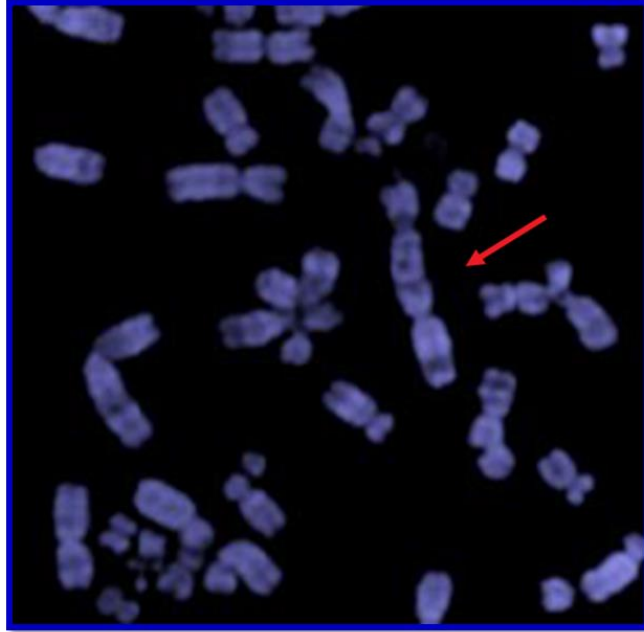
3.14. Η EXD2 προστατεύει από τις -προκαλούμενες από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2^{ΔM/ΔB}- συντήξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων στα ALT κύτταρα

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8a και cl.19. Τα κύτταρα αυτά διαμολύνθηκαν με lenti-ιό που φέρει το πλασμίδιο αντιμορφικής μετάλλαξης (dominant negative) του TRF2, TRF2^{ΔM/ΔB}. Μετά το πέρας 6, 8, και 15 ημερών από τη διαμόλυνση, και ανακαλλιέργειες των κυττάρων, παρελήφθησαν μεταφασικά χρωμοσώματα, στα οποία έγινε προσθήκη DAPI-Vectashield. Η φωτογράφιση έγινε με χρήση του μικροσκοπίου Zeiss Axio-ImagerZ1

και 6x φακού, και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Isis της Metasystems. Για κάθε συνθήκη έλαβε χώρα μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και των συντήξεων αυτών σε 25 διαφορετικές μεταφάσεις με τη βοήθεια του επιβλέποντος μου, Δρ Σαράντη Γκάγκου, η οποία αναπαρίσταται στο Σχήμα 45 για τις 15 μέρες μετά τη διαμόλυνση.



Σχήμα 45: Γράφημα στο οποίο διακρίνεται ότι η EXD2 προστατεύει από τις -προκαλούμενες από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2^{ΔM/ΔB} του TRF2- χρωμοσωμικές συντήξεις στα ALT κύτταρα. Διαμόλυνση με την μορφή TRF2^{ΔM/ΔB}, και έπειτα από 15 ημέρες καλλιέργειας, παρατηρείται ότι η απουσία της EXD2 ελαττώνει σημαντικά τις συντήξεις των χρωμοσωμάτων που προκαλεί η έκφραση της TRF2^{ΔM/ΔB} στα U2OS WT.



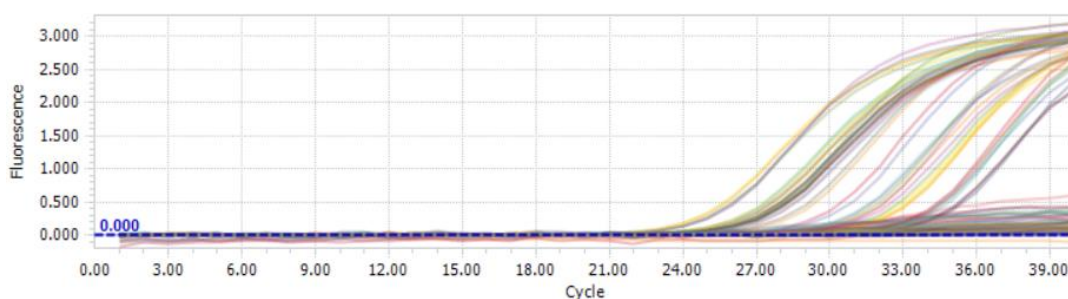
Σχήμα 46: Ενδεικτική φωτογραφία U2OS WT κυττάρων στην οποία διακρίνεται χαρακτηριστική χρωμοσωμική σύντηξη, προκληθείσα από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2^{ΔM/ΔB} του TRF2. DAPI: ψευδοχρώση μπλε, 63x μεγέθυνση, Zeiss Axio-ImagerZ1.

Παρατηρείται ότι διαμόλυνση με την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2^{ΔM/ΔB} του TRF2, και έπειτα από 6, 8, και 15 ημέρες καλλιέργειας, η απουσία της EXD2 ελαττώνει σημαντικά τις συντήξεις των χρωμοσωμάτων που προκαλεί η έκφραση της στα TRF2^{ΔM/ΔB} U2OS WT. Το πείραμα επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα, με τις διαφορές ανάμεσα στα U2OS WT και U2OS EXD2 KO κύτταρα να είναι στατιστικά σημαντικές με **p<0.0056** για την περίπτωση του κλώνου 8α, και **p<0.0002** στην περίπτωση του κλώνου 19. Η στατιστική ανάλυση έλαβε χώρα με τη χρήση του προγράμματος GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test και Mann-Whitney U test, ενώ το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel.

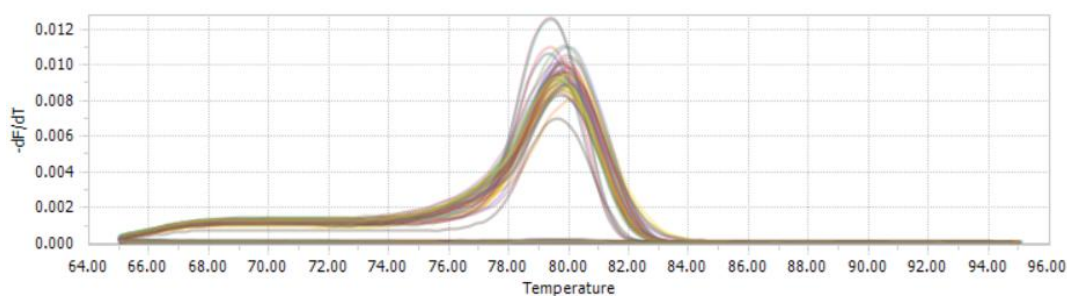
3.15. Η EXD2 καταστέλλει τη βιογένεση των C-Circles

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα U2OS και U2OS EXD2 KO cl.8α και cl.19, τα οποία είναι ALT⁺, καθώς και τα telomerase⁺ HeLa, προς σύγκριση.

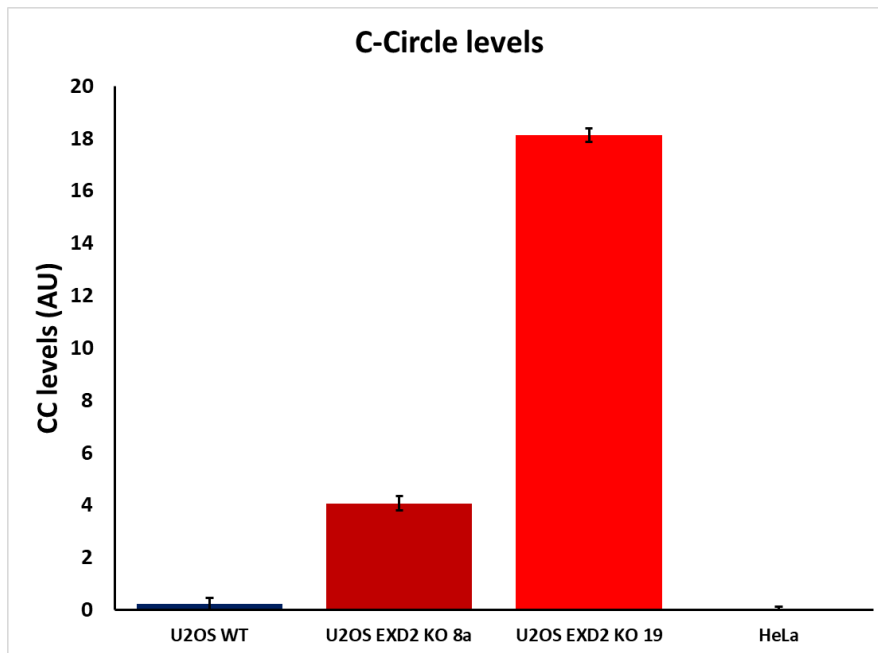
Αρχικά, απομονώθηκε το DNA από τις παραπάνω καλλιέργειες με χρήση του κατάλληλου κιτ της QIAGEN. Κατόπιν, έλαβε χώρα εκλεκτική ενίσχυση των προϊόντων C-circles με τη χρήση της φ29 πολυμεράσης. Τέλος, ακολούθησε RT-PCR για την ανίχνευση των προϊόντων αυτών με τη χρήση τελομερικών εκκινητών. Πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη RT-PCR με τη χρήση ανιχνευτών για το γονίδιο που βρίσκεται σε μονό αντίγραφο (single-copy gene), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων από την περίπτωση των τελομερικών εκκινητών. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με χρήση του προγράμματος Microsoft Excel, σύμφωνα με το ακριβές πρωτόκολλο C-circle assay (Lau *et al.*, 2013).



Σχήμα 47: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για τους τελομερικούς εκκινητές.



Σχήμα 48: Καμπύλες τήξεως RT-PCR για τους τελομερικούς εκκινητές. Παρατηρείται η απουσία διμερών εκκινητών. Από το πλήθος των διαφορετικών καμπυλών, μπορεί να διακριθεί η παρουσία προϊόντων διαφορετικών μηκών, που αντιπροσωπεύουν την ποικιλία μεγεθών των C-circles.



Σχήμα 49: Γράφημα στο οποίο φαίνεται ότι η EXD2 καταστέλλει τη βιογένεση των C-Circles. Στα telomerase⁺ κύτταρα HeLa, τα επίπεδα των C-circles τείνουν στο 0, ενώ σημαντική διαφορά παρουσιάζουν τα U2OS WT, τα οποία ως ALT κύτταρα εμφανίζουν C-circles. Στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2, παρατηρείται ραγδαία αύξηση των επιπέδων των C-circles.

Εμφανίζονται ενδεικτικά δύο γραφήματα από την RT-PCR με χρήση τελομερικών εκκινητών. Αντίστοιχα γραφήματα παρατηρούνται και στους εκκινητές για το single-copy gene. Από τις καμπύλες τήξεως RT-PCR για τους τελομερικούς εκκινητές, παρατηρείται η απουσία διμερών εκκινητών, ενώ από το πλήθος των διαφορετικών καμπυλών, μπορεί να διακριθεί η παρουσία διαφορετικών μηκών προϊόντων, που αντιπροσωπεύουν την ποικιλία μεγεθών των C-circles που παράγονται στα ALT κύτταρα. Κατόπιν επεξεργασίας των δεδομένων της PCR, παρατηρείται ότι, όπως είναι αναμενόμενο, στα telomerase⁺ κύτταρα HeLa, τα επίπεδα των C-circles τείνουν στο 0, ενώ σημαντική διαφορά παρουσιάζουν τα U2OS WT, τα οποία ως ALT κύτταρα εμφανίζουν C-circles. Στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2, παρατηρείται ραγδαία αύξηση των επιπέδων των C-circles. Το πείραμα επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα με στατιστική σημαντικότητα με $p < 0.0001$. Η στατιστική ανάλυση έλαβε χώρα με τη χρήση του προγράμματος GraphPad, και εφαρμογή unpaired t-test και Mann-

Whitney U test, ενώ το διάγραμμα κατασκευάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel.

Συζήτηση

Η πιο επιβλαβής μορφή βλάβης του DNA είναι οι διπλόκλωνες θραύσεις, DSB, των οποίων η αναγνώριση και επιδιόρθωση είναι θεμελιώδεις για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Οι δύο βασικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση των DSBs στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ο -επιρρεπής σε λάθη- μηχανισμός μη ομόλογης σύνδεσης των άκρων, NHEJ, και ο -ακριβής- μηχανισμός ομόλογου ανασυνδυασμού, HR (Jackson and Bartek, 2009; Jasin and Haber, 2016). Μετά την αναγνώριση της βλάβης, το αρχικό βήμα στον HR είναι η εκτομή των άκρων DNA που πλαισιώνουν τη DSB, η οποία μέχρι τώρα θεωρείται πως μεσολαβείται από το σύμπλοκο MRE11-RAD50-NBS1, MRN και την πρωτεΐνη CtIP, των οποίων η δράση δημιουργεί μικρά τμήματα μονόκλωνου DNA, ssDNA (Symington and Gautier, 2011; Symington, 2014; Symington, Rothstein and Lisby, 2014). Τα επεξεργασμένα άκρα υφίστανται περεταίρω νουκλεολυτική επεξεργασία από τις νουκλεάσες EXO1 ή DNA2, σε συνεργασία με την ελικάση BLM, ως σύμπλοκα BLM-DNA2 ή BLM-EXO1 προς παραγωγή μακρύτερων 3'-προεξοχών ssDNA (Mimitou and Symington, 2008). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε η πρωτεΐνη EXD2 ως νέος συμπαράγοντας του συμπλόκου MRN, με δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης, ο οποίος οδηγεί στην ταχύτερη παραγωγή μεγαλύτερου μήκους μονόκλωνου DNA, που ενδεχομένως αποτελεί ένα καλύτερο υπόστρωμα για τη δράση των BLM-DNA2/EXO1 στη συνέχεια (Broderick *et al.*, 2016).

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι ο μηχανισμός που διέπει τον ALT στην ανθρώπινη νεοπλασία αποτελεί μια συντηρητική διαδικασία αντιγραφής DNA, ενορχηστρωμένη από το μηχανισμό ανασυνδυαστικής επιδιόρθωσης διπλόκλωνων θραύσεων του DNA, BIR (Dilley *et al.*, 2016; Roumelioti *et al.*, 2016; Min, Wright and Shay, 2017; Sobinoff and Pickett, 2017). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Τα ευρήματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σε συνδυασμό με περαιτέρω αποτελέσματα της ομάδας του εργαστηρίου μου και των συνεργατών μας, δείχνουν ότι η EXD2 ενδεχομένως αποτελεί σημαντικό μόριο στον μηχανισμό alt-NHEJ και τα τελομερή.

Αρχικά, διερευνήθηκε κατά πόσον η EXD2 διαδραματίζει ρόλο στη δημιουργία των χρωμοσωμικών βλαβών. Με χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα cisplatin, παρατηρείται σημαντική αύξηση του αριθμού των θραύσεων των χρωμοσωμάτων, σε κύτταρα HeLa από τα οποία απουσιάζει η EXD2, σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα HeLa, καθώς και σε σχέση με την ομάδα control που έλαβε μόνο

τον διαλύτη της cisplatin. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε τρεις φορές με στατιστική σημαντικότητα των διαφορών με $p < 0.04$, αποδεικνύοντας ότι η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες σε telomerase⁺ κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί με cisplatin στα RPE1 κύτταρα, καθώς η χορήγηση της cisplatin οδηγούσε τα κύτταρα σε απόπτωση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%. Για το λόγο αυτό, το πείραμα πραγματοποιήθηκε με παρεμφερή τρόπο. Κατόπιν συγχρονισμού κυττάρων RPE1 και των αντιστοιχών με πλήρη αποσιώπηση της EXD2, και χορήγηση του παράγοντα arhidicolin που δημιουργεί στρες αντιγραφής, απουσία της EXD2 οι χρωμοσωμικές θραύσεις ήταν σημαντικά αυξημένες, δείχνοντας ότι η EXD2 προστατεύει από τις χρωμοσωμικές βλάβες και σε αθανατοποιημένα με hTERT κύτταρα.

Στην περίπτωση των ALT κυττάρων, η διερεύνηση της ακριβούς δράσης της EXD2 ήταν διεξοδική. Αρχικά, η EXD2 σχηματίζει διακριτά πυρηνικά κοκκία στους πυρήνες των ALT κυττάρων, όπως διαφαίνεται από πειράματα στα οποία η υπερέκφρασή της οδηγεί σε αύξηση των διακριτών πυρηνικών κοκκίων της. Αυτά τα πυρηνικά κοκκία είναι εξαρτώμενα από τη βλάβη στο DNA στα ALT κύτταρα, καθώς η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα cisplatin ο οποίος προκαλεί βλάβες στο DNA, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκαλεί σημαντική αύξηση στον αριθμό αυτών στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2, σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία η έκφρασή της είναι η φυσιολογική. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές, επιβεβαιώνοντας εις τριπλούν το παρόν αποτέλεσμα, με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές με $p < 0.0001$.

Επιπροσθέτως, τα πυρηνικά κοκκία της EXD2 συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη TRF2, αλλά και τα ίδια τα τελομερή, όπως δείχνουν τα πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού και ανοσοφθορισμού-συζευγμένου με φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση στις αντίστοιχες συνθήκες υπερέκφρασης. Αυτό επιβεβαιώθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους εγγενούς σήμανσης της υπερεκφραζόμενης EXD2, σημασμένης με GFP ή FLAG. Τα παραπάνω αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις ότι η παρουσία της EXD2 κατέχει σημαντική δράση στα τελομερή των ALT κυττάρων. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από την ερευνητική ομάδα του συνεργάτη μας, Dr Wojciech Niedzwiedz, με χρήση της μεθόδου Proximity-Ligation Assay (PLA) (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού ALT αποτελεί η συχνή εμφάνιση των -συσχετιζόμενων με τον ALT- PML πυρηνικών σωματίων, APBs. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, τα πυρηνικά σωματίδια APBs αποτελούν υποπυρηνικά διαμερίσματα πλούσια στην πρωτεΐνη PML, τελομερικό DNA, καθώς και παράγοντες που συνδέονται με το αυτό καθ' αυτό τελομερές, όπως οι TRF1, TRF2, POT1, αλλά και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στους μηχανισμούς απόκρισης και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (Nabetani and Ishikawa, 2011; Chung *et al.*, 2012), ενώ επίσης θεωρούνται θέσεις της ανασυνδυαστικής επιμήκυνσης των τελομερών του μηχανισμού ALT (Draskovic *et al.*, 2009; Osterwald *et al.*, 2015). Ενδιαφέρον αποτελεί ο σχηματισμός διακριτών πυρηνικών κοκκίων της EXD2 οι οποίες συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη PML στους πυρήνες των ALT κυττάρων. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης EXD2 προκαλεί αύξηση του αριθμού των συνεντοπισμών αυτής με την PML, η οποία αύξηση είναι ανεξάρτητη από το πλήθος των πυρηνικών κοκκίων PML σε εκάστοτε πυρήνα, δείχνοντας ότι η EXD2 αποτελεί τμήμα των APBs. Αν πράγματι η EXD2 είναι σημαντική για την ομοιόσταση των ALT τελομερών, τότε θα έπρεπε με κάποιον τρόπο να επηρεάζει και τη βιογένεση των APBs. Πράγματι, απουσία της πρωτεΐνης EXD2 παρατηρείται σημαντική αύξηση του αριθμού των συνεντοπισμών της PML με την TRF2, υποδεικνύοντας έτσι, τον ανασταλτικό ρόλο της EXD2 στη βιογένεση των APBs. Το τελευταίο πείραμα επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα, δείχνοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές με **p<0.0001**. Αποτελεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον η περαιτέρω διερεύνηση για την αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου η EXD2 συμμετέχει στη βιογένεση των APBs.

Η EXD2 ως ένα νέος συμπαράγοντας του συμπλόκου MRN, εμφανίζει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης, η οποία να επιταχύνει την εκτομή των διπλόκλωνων θραύσεων του DNA (Broderick *et al.*, 2016). Επόμενο ήταν να εξετάσουμε τη δράση της EXD2 στα τελομερή. Με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού παρατηρείται αυξημένος συνεντοπισμός των RPA1 και RPA2, οι οποίες αποτελούν πρωτεΐνες που προσδένονται αποκλειστικά σε μονόκλωνο DNA, με τον TRF2 στα U2OS κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2 σε σχέση με τα WT, που αποκαλύπτει ότι η EXD2 εμφανίζει δράση εξωνουκλεάσης στα τελομερή. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το πείραμα ND-FISH, με χρήση PNA-ανιχνευτή που αναγνωρίζει τον μονόκλωνο G-

κλώνο των τελομερών, στο οποίο υπερέκφραση της EXD2 προκαλεί σημαντική αύξηση των μονόκλωνων τελομερικών σημάτων στον G-κλώνο στα τελομερή, αποδεικνύοντας ότι η EXD2 εμφανίζει δράση εξωνουκλεάσης σε αυτές τις περιοχές. Ομοίως, επόμενος στόχος είναι να εξεταστεί αν η δράση αυτή περιορίζεται μόνο στον G-κλώνο, ή επεκτείνεται και στον C-κλώνο.

Απουσία της EXD2, παρατηρείται αυξημένη συνεντόπιση της ειδικής για μονόκλωνο DNA πρωτεΐνης RPA2, με την ειδική για τα τελομερή πρωτεΐνη TRF2. Ως εκ τούτου, υποδηλώνεται η αύξηση των επιπέδων του μονόκλωνου τελομερικού DNA. Δεδομένου ότι η EXD2 συνεργάζεται με την πρωτεΐνη MRE11 του συμπλόκου MRN για την αποτελεσματική νουκλεολυτική επεξεργασία των διπλόκλωνων θραύσεων (Broderick *et al.*, 2016), είναι πιθανό η απουσία της EXD2 να επιτρέπει την ανεξέλεγκτη δράση της MRE11, με αποτέλεσμα την δημιουργία μονόκλωνων τμημάτων αυξημένου μήκους. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και στους δύο κλώνους U2OS EXD2 KO, και ήδη επρόκειτο να επαληθευτεί στην περίπτωση των συνεντοπισμών RPA1 και TRF2.

Τα τελομερή των ALT κυττάρων χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυξημένου ομόλογου τελομερικού ανασυνδυασμού, ο οποίος διαφαίνεται από την αυξημένη συχνότητα των τελομερικών ανταλλαγών μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, T-SCEs (Graakjaer *et al.*, 2004; Pickett and Reddel, 2015). Στην περίπτωση της EXD2, υπερέκφραση της EXD2 ελαττώνει τον αριθμό των T-SCEs που λαμβάνουν χώρα και στους δύο τελομερικούς κλώνους, δείχνοντας ότι η υπερέκφραση της EXD2 καταστέλλει το κλασικό ομόλογο ανασυνδυασμό, c-HR, στα τελομερή των ALT κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται από αντίστοιχα πειράματα σε U2OS κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2, τα οποία λαμβάνουν χώρα την παρούσα στιγμή στο εργαστήριό μας, όπου απουσία της EXD2 παρατηρείται αύξηση στις T-SCEs.

Η απουσία της EXD2 αυξάνει τον αριθμό των ακάλυπτων τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων (telomere free ends) στα ALT κύτταρα, που σημαίνει ότι τα τελομερή στα άκρα αυτά είναι αρκετά ελαττωμένα σε μήκος, ώστε καθίστανται μη επαρκώς ανιχνεύσιμα από τον PNA-ανιχνευτή προς δημιουργία οπτικά εμφανούς σήματος. Για το λόγο αυτό, προσδιορίζεται στη συνέχεια το μήκος των τελομερών με τη μέθοδο Q-FISH, όπου παρατηρείται ότι απουσία της EXD2, υπάρχει ελάττωση του

μέσου μήκους των τελομερών. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική ελάττωση του τελομερικού μήκους στον G-κλώνο, αλλά μικρότερη ελάττωση του τελομερικού μήκους στον C-κλώνο σε ALT κύτταρα. Και στις δύο περιπτώσεις η ελάττωση του τελομερικού μήκους δεν είναι τόσο ισχυρή ώστε να είναι επιβλαβής, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά.

Παρατηρώντας τις μεταφάσεις των κυττάρων στα οποία έχει αποσιωπηθεί πλήρως η EXD2, είναι εμφανής η παρουσία χρωμοσωμικών θραύσεων, όπως έχουμε ήδη δείξει ότι συμβαίνει στις telomerase⁺ και αθανατοποιημένες με hTERT κυτταρικές σειρές, δείχνοντας ότι η EXD2 προστατεύει τα κύτταρα από τέτοιου είδους χρωμοσωμικές διαταραχές. Για να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα αυτό με επιπλέον ποσοτικό τρόπο, διαμολύνουμε τα U2OS WT και U2OS EXD2 KO κύτταρα με lenti-ιό που φέρει πλασμίδιο με κασέττα για την έκφραση της αντιμορφικής μετάλλαξης (dominant negative) του TRF2, TRF2^{ΔM/ΔB}. Η παρουσία TRF2^{ΔM/ΔB} είναι γνωστό ότι προκαλεί συντήξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων, το πλήθος των οποίων εξαρτάται από την κυτταρική σειρά (van Steensel, Smogorzewska and de Lange, 1998). Η διαμόλυνση με τον ιό οδηγεί στην εμφάνιση συντήξεων από την 6^η ημέρα, των οποίων ο αριθμός δεν διαφοροποιείται την 8^η ημέρα, ωστόσο αυξάνεται την 15^η ημέρα, στα U2OS WT κύτταρα. Προς ποσοτικοποίηση επιλέγεται η 15^η ημέρα, λόγω του εντονότερου φαινοτύπου στα κύτταρα control. Την ημέρα αυτή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική ελάττωση των συντήξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων απουσία της EXD2, δείχνοντας ότι η απουσία της EXD2 προστατεύει από τις -προκαλούμενες από την αντιμορφική μετάλλαξη TRF2^{ΔM/ΔB}- συντήξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων στα ALT κύτταρα. Το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα, με τις διαφορές ανάμεσα στα U2OS WT και U2OS EXD2 KO κύτταρα να είναι στατιστικά σημαντικές με **p<0.0056** για την περίπτωση του κλώνου 8α, και **p<0.0002** στην περίπτωση του κλώνου 19.

Δεδομένου ότι οι συντήξεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων λαμβάνουν χώρα μέσω του μηχανισμού NHEJ (Smogorzewska *et al.*, 2002), και παρά τον σχηματισμό χρωμοσωμικών θραύσεων στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2, τα ποσοστά των συντήξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων είναι ελαττωμένα, υποδηλώνοντας σημαντικό ρόλο του EXD2 στον μηχανισμό alt-NHEJ. Πράγματι, η ερευνητική ομάδα του συνεργάτη μας, Dr Wojciech Niedzwiedz, δείχνει ότι η EXD2 προάγει το

μηχανισμό MMEJ, με χρήση της κυτταρικής σειράς U2OS-EJ2-GFP που φέρι ειδική κασσέτα για τον μηχανισμό αυτό (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Υπάρχει, ωστόσο, ανοιχτό το ενδεχόμενο της συμμετοχής της στο μηχανισμό BIR, το οποίο θα εξεταστεί στο εργαστήριό μας στο άμεσα επερχόμενο χρονικό διάστημα.

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των ALT κυττάρων αποτελεί η εμφάνιση άφθονων ποσοτήτων εξωχρωμοσωμικού, μονόκλωνου, δίκλωνου, η συνδυασμού αυτών, κυκλικού και πλούσιου σε G ή C τελομερικού DNA, το μέσο μέγεθος του οποίου κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες bp έως 50 kb (Komosa, Root and Meyn, 2015). Η ποσοτικοποίηση μιας από τις παραπάνω περιπτώσεις, του κυκλικού, C-τελομερικού DNA C-circles, αποτελεί σήμερα μια από τις της πλέον αξιόπιστες τεχνολογίες για την χαρακτηρισμό ενός κυτταρικού πληθυσμού ως ALT (Henson *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2013). Είναι γνωστό ότι telomerase⁺ κύτταρα, έχουν ελάχιστη έως μηδενική παραγωγή C-circles, σε αντίθεση με τα ALT⁺ κύτταρα τα οποία εμφανίζουν C-circles ποικίλου μεγέθους και ποσοτήτων (Henson *et al.*, 2009). Με εφαρμογή της μεθόδου για την ποσοτικοποίηση των C-circles, αποκαλύπτεται ότι στην περίπτωση των κυττάρων HeLa, τα επίπεδα των C-circles τείνουν στο 0, όπως αναμένεται για μια telomerase⁺ κυτταρική σειρά, ενώ σημαντική διαφορά παρουσιάζουν τα U2OS WT. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η EXD2, παρατηρείται δραματική αύξηση των επιπέδων των C-circles. Το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές, επιβεβαιώνοντας το παρόν αποτέλεσμα με στατιστική σημαντικότητα με **p<0.0001**. Ωστόσο, λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου, η οποία ανιχνεύει τις παραμικρές ποσότητες DNA, και επομένως ελάχιστες διαφορές στην αρχική ποσότητα DNA (input) οδηγούν σε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των C-circles που ανιχνεύονται με την RT-PCR, το πείραμα θα επαναληφθεί ακόμη μία φορά, καθώς επίσης και αντίστοιχο πείραμα με κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η EXD2.

Πέραν των προαναφερθέντων πειραμάτων που επρόκειται να επαναληφθούν και επιβεβαιωθούν, πλέον διαθέτουμε δεύτερο κλώνο κυττάρων U2OS ο οποίος υπερεκφράζει την EXD2 συζευγμένη με GFP, για τον οποίον σε συνδυασμό με το control του, θα επαναλάβουμε τα αντίστοιχα πειράματα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η διερεύνηση της παραπάνω αρνητικής συσχέτισης της EXD2 με τον μηχανισμό BIR,

η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση της τεχνικής του τριπλού-FISH (Roumelioti *et al.*, 2016), ή με τη μέθοδο Click-IT-Edu (Bhowmick, Minocherhomji and Hickson, 2016; Min, Wright and Shay, 2017; Özer *et al.*, 2018). Στα άμεσα σχέδια αποτελεί η δημιουργία συντήξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων με τη χρήση ακτινοβολίας, για την επιβεβαίωση του αποτελέσμάτος μας με την έκφραση TRF2^{ΔM/ΔB}. Συνολικά, επρόκειτο να διερευνήσουμε με ποιον τρόπο οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και το ρόλο της EXD2 στην επιλογή του ενός μηχανισμού έναντι του άλλου. Η βιβλιογραφία, σε συνδυασμό με τα παρόντα αποτελέσματα, καθώς και τα αποτελέσματα των συνεργατών μας, καθιστούν την EXD2 ως μία νέα καίρια συνιστώσα των μηχανισμών επιδιόρθωσης και διατήρησης της ομοιόστασης των τελομερών μέσω MMEJ και προστασίας του βρόγχου αντιγραφής, η οποία μελλοντικά μπορεί να αποτελέσει στόχο ανάπτυξης θεραπευτικών στρατηγικών για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Alberts, B. *et al.* (2002) *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition*. Garland Science. Available at: citeulike-article-id:691434.
2. Avilion, A. A. *et al.* (1996) 'Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues', *Cancer Research*, 56(3), pp. 645–650. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-6377.
3. Bhattacharjee, S. and Nandi, S. (2016) 'Choices have consequences: the nexus between DNA repair pathways and genomic instability in cancer', *Clinical and Translational Medicine*. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 5, p. 45. doi: 10.1186/s40169-016-0128-z.
4. Bhowmick, R., Minocherhomji, S. and Hickson, I. D. (2016) 'RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress', *Molecular Cell*, 64(6), pp. 1117–1126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.037>.
5. Bianchi, A. *et al.* (1997) 'TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA', *EMBO Journal*, 16(7), pp. 1785–1794. doi: 10.1093/emboj/16.7.1785.
6. Blackburn, E. H. and Gall, J. G. (1978) 'A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*', *Journal of Molecular Biology*, 120(1), pp. 33–53. doi: 10.1016/0022-2836(78)90294-2.
7. Bollmann, F. M. (2007) 'Targeting ALT: The role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer', *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier, 33(8), pp. 704–709. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.08.006.
8. Broccoli, D. *et al.* (1997) 'Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 17(2), p. 235. doi: 10.1038/ng1097-231.
9. Broderick, R. *et al.* (2016) 'EXD2 promotes homologous recombination by facilitating DNA end resection', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18, p. 271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3303>.
10. Bryan, T. M. *et al.* (1997) 'Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines', *Nature Medicine*, 3(11), pp. 1271–1274. doi: 10.1038/nm1197-1271.
11. Cesare, A. J. and Reddel, R. R. (2010) 'Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications', *Nature Reviews Genetics*. Nature

- Publishing Group, 11, p. 319. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2763>.
12. Chiruvella, K. K., Liang, Z. and Wilson, T. E. (2013) 'Repair of Double-Strand Breaks by End Joining', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5(5), p. a012757. doi: 10.1101/cshperspect.a012757.
 13. Christodoulidou, A. *et al.* (2013) 'The Roles of Telomerase in the Generation of Polyploidy during Neoplastic Cell Growth', *Neoplasia (New York, N.Y.)*. Neoplasia Press Inc., 15(2), pp. 156–168. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579318/>.
 14. Chung, I. *et al.* (2012) 'PML body meets telomere: The beginning of an ALternate ending?', *Nucleus*. Landes Bioscience, 3(3), pp. 263–275. doi: 10.4161/nucl.20326.
 15. Cong, Y.-S., Wright, W. E. and Shay, J. W. (2002) 'Human Telomerase and Its Regulation', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 66(3), pp. 407–425. doi: 10.1128/MMBR.66.3.407-425.2002.
 16. Cooper, G. M. (2000) *The Cell - A Molecular Approach 2nd Edition*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Available at: citeulike-article-id:10266975.
 17. Corey, D. R. (2009) 'Telomeres and Telomerase: From Discovery to Clinical Trials', *Chemistry & biology*, 16(12), pp. 1219–1223. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.12.001.
 18. Costantino, L. *et al.* (2014) 'Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells', *Science (New York, N.Y.)*, 343(6166), pp. 88–91. doi: 10.1126/science.1243211.
 19. Decottignies, A. (2013) 'Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective', *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A., 4, p. 48. doi: 10.3389/fgene.2013.00048.
 20. Difilippantonio, M. J. *et al.* (2000) 'DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation', *Nature*, 404(6777), pp. 510–514. doi: 10.1038/35006670.
 21. Dilley, R. L. *et al.* (2016) 'Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance', *Nature*. Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved., 539, p. 54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20099>.
 22. Donnianni, R. A. and Symington, L. S. (2013) 'Break-induced replication occurs by

- conservative DNA synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(33), pp. 13475–13480. doi: 10.1073/pnas.1309800110.
23. Draskovic, I. *et al.* (2009) 'Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), p. 15726 LP-15731. Available at: <http://www.pnas.org/content/106/37/15726.abstract>.
24. Durante, M. *et al.* (2013) 'From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break', *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 756(1), pp. 5–13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.014>.
25. Duydu, Y. *et al.* (2005) 'Increased sensitivity to mitomycin C-induced sister chromatid exchange in lymphocytes from patients undergoing hyperbaric oxygen therapy', *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Wiley-Blackwell, 47(3), pp. 185–191. doi: 10.1002/em.20184.
26. Fairall, L. *et al.* (2001) 'Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2', *Molecular Cell*. Elsevier, 8(2), pp. 351–361. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00321-5.
27. Feng, J. *et al.* (1995) 'The RNA component of human telomerase', *Science*, 269(5228), p. 1236 LP-1241. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/269/5228/1236.abstract>.
28. Gagos, S. *et al.* (2008) 'Pericentromeric Instability and Spontaneous Emergence of Human Neoacrocentric and Minute Chromosomes in the Alternative Pathway of Telomere Lengthening', *Cancer Research*, 68(19), p. 8146 LP-8155. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/19/8146.abstract>.
29. Gaillard, H., García-Muse, T. and Aguilera, A. (2015) 'Replication stress and cancer', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 15, p. 276. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3916>.
30. García-Cao, M. *et al.* (2003) 'Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 36, p. 94. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/ng1278>.

31. Graakjaer, J. *et al.* (2004) 'The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life', *Aging Cell*. Wiley/Blackwell (10.1111), 3(3), pp. 97–102. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00093.x.
32. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985) 'Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts', *Cell*, 43(2 PART 1), pp. 405–413. doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.
33. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1987) 'The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity', *Cell*, 51(6), pp. 887–898. doi: 10.1016/0092-8674(87)90576-9.
34. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1989) 'A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis', *Nature*. Nature Publishing Group, 337, p. 331. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/337331a0>.
35. Griffith, J. D. *et al.* (1999) 'Mammalian telomeres end in a large duplex loop', *Cell*. Elsevier, 97(4), pp. 503–514. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80760-6.
36. Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990) 'Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts', *Nature*. Nature Publishing Group, 345, p. 458. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/345458a0>.
37. Harrington, L. *et al.* (1997) 'Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits', *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(23), pp. 3109–3115. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316744/>.
38. Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*, 25(3), pp. 585–621. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).
39. Hefferin, M. L. and Tomkinson, A. E. (2005) 'Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining', *DNA Repair*, 4(6), pp. 639–648. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.005>.
40. Henson, J. D. *et al.* (2009) 'DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 27, p. 1181. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1587>.
41. Henson, J. D. and Reddel, R. R. (2010) 'Assaying and investigating Alternative

- Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers', *FEBS Letters*. Wiley-Blackwell, 584(17), pp. 3800–3811. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.009.
42. Hoeijmakers, J. H. J. (2009) 'DNA Damage, Aging, and Cancer', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 361(15), pp. 1475–1485. doi: 10.1056/NEJMra0804615.
43. van Holde, K. E. (1989) *Chromatin*. 1st edn. Springer-Verlag New York. doi: 10.1007/978-1-4612-3490-6.
44. Holt, S. E. and Shay, J. W. (1999) 'Role of telomerase in cellular proliferation and cancer', *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Blackwell, 180(1), pp. 10–18. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<10::AID-JCP2>3.0.CO;2-D.
45. Hunter, N. and Kleckner, N. (2001) 'The Single-End Invasion', *Cell*. Elsevier, 106(1), pp. 59–70. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00430-5.
46. Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009) 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, 461(7267), pp. 1071–1078. doi: 10.1038/nature08467.
47. Jain, S. *et al.* (2009) 'A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair', *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 23(3), pp. 291–303. doi: 10.1101/gad.1751209.
48. Jasin, M. and Haber, J. E. (2016) 'The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair', *DNA Repair*, 44, pp. 6–16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.001>.
49. Kass, E. M. and Jasin, M. (2010) 'Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways', *FEBS letters*, 584(17), pp. 3703–3708. doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.057.
50. Keijzers, G. *et al.* (2014) 'The role of RecQ helicases in non-homologous end-joining', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(6), pp. 463–472. doi: 10.3109/10409238.2014.942450.
51. Kim, N. W. *et al.* (1994) 'Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer', *Science*, 266(5193), p. 2011 LP-2015. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/266/5193/2011.abstract>.
52. Komosa, M., Root, H. and Meyn, M. S. (2015) 'Visualization and quantitative analysis of extrachromosomal telomere-repeat DNA in individual human cells by

- Halo-FISH', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 43(4), pp. 2152–2163. doi: 10.1093/nar/gkv091.
53. Kraus, E., Leung, W.-Y. and Haber, J. E. (2001) 'Break-induced replication: A review and an example in budding yeast', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. The National Academy of Sciences, 98(15), pp. 8255–8262. doi: 10.1073/pnas.151008198.
54. Krejci, L. *et al.* (2003) 'DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 423, p. 305. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01577>.
55. Kroustallaki, P. and Gagos, S. (2015) *Structure and Functions of Telomeres in Organismal Homeostasis and Disease*. doi: 10.1007/978-1-4939-3070-8_10.
56. Lau, L. M. S. *et al.* (2013) 'Detection of alternative lengthening of telomeres by telomere quantitative PCR', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 41(2), pp. e34–e34. doi: 10.1093/nar/gks781.
57. Lindahl, T. (1993) 'Instability and decay of the primary structure of DNA', *Nature*. Nature Publishing Group, 362, p. 709. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/362709a0>.
58. Lingner, J. *et al.* (1997) 'Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase', *Science*, 276(5312), p. 561 LP-567. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/276/5312/561.abstract>.
59. Llorente, B., Smith, C. E. and Symington, L. S. (2008) 'Break-induced replication: What is it and what is it for?', *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 7(7), pp. 859–864. doi: 10.4161/cc.7.7.5613.
60. Ma, Y. *et al.* (2005) 'Repair of Double-Strand DNA Breaks by the Human Nonhomologous DNA End Joining Pathway: The Iterative Processing Model', *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 4(9), pp. 1193–1200. doi: 10.4161/cc.4.9.1977.
61. Magdalou, I. *et al.* (2014) 'The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, pp. 154–164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.035>.
62. Malkova, A. *et al.* (2001) 'RAD51-independent break-induced replication to repair a broken chromosome depends on a distant enhancer site', *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(9), pp. 1055–1060. doi:

10.1101/gad.875901.

63. Malkova, A., Ivanov, E. L. and Haber, J. E. (1996) 'Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14), pp. 7131–7136. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38948/>.
64. Martínez, P. and Blasco, M. A. (2017) 'Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies', *The Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 216(4), pp. 875–887. doi: 10.1083/jcb.201610111.
65. McClintock, B. (1941) 'The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays', *Genetics*, 26(2), pp. 234–282. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1209127/>.
66. Michel, B. (2000) 'Replication fork arrest and DNA recombination', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier, 25(4), pp. 173–178. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01560-7.
67. Mimitou, E. P. and Symington, L. S. (2008) 'Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing', *Nature*. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved, 455, p. 770. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07312>.
68. Min, J., Wright, W. E. and Shay, J. W. (2017) 'Alternative lengthening of telomeres can be maintained by preferential elongation of lagging strands', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(5), pp. 2615–2628. doi: 10.1093/nar/gkw1295.
69. Morin, G. B. (1989) 'The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats', *Cell*. Elsevier, 59(3), pp. 521–529. doi: 10.1016/0092-8674(89)90035-4.
70. Morrow, D. M., Connelly, C. and Hieter, P. (1997) "'break Copy" Duplication: A Model for Chromosome Fragment Formation in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Genetics*, 147(2), pp. 371–382. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1208164/>.
71. Muller, J. H. (1938) 'The remaking of chromosomes', *The collectiong Net*, XIII(116), pp. 180–195.
72. Nabetani, A. and Ishikawa, F. (2011) 'Alternative lengthening of telomeres

- pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells', *The Journal of Biochemistry*, 149(1), pp. 5–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvq119>.
73. Nakamura, J. and Swenberg, J. A. (1999) 'Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues', *Cancer Research*, 59(11), pp. 2522–2526. doi: 10.1038/362709a0.
 74. Nieminuszczy, J., Broderick, R. and Niedzwiedz, W. (2016) 'EXD2 - a new player joins the DSB resection team', *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 15(12), pp. 1519–1520. doi: 10.1080/15384101.2016.1161997.
 75. O'Connor, M. S. *et al.* (2004) 'The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length', *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), pp. 28585–28591. doi: 10.1074/jbc.M312913200.
 76. O'Connor, M. S. *et al.* (2006) 'A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(32), pp. 11874–11879. doi: 10.1073/pnas.0605303103.
 77. O'Sullivan, R. J. *et al.* (2014) 'Rapid induction of alternative lengthening of telomeres by depletion of the histone chaperone ASF1', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 21, p. 167. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2754>.
 78. Olovnikov, A. M. (1971) 'Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides.', *Doklady Akademii nauk SSSR*, 201(6), pp. 1496–9.
 79. Osterwald, S. *et al.* (2015) 'PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening', *Journal of Cell Science*, 128(10), p. 1887 LP-1900. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/128/10/1887.abstract>.
 80. Özer, Ö. *et al.* (2018) 'Human cancer cells utilize mitotic DNA synthesis to resist replication stress at telomeres regardless of their telomere maintenance mechanism', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 9(22), pp. 15836–15846. doi: 10.18632/oncotarget.24745.
 81. Palm, W. and de Lange, T. (2008) 'How Shelterin Protects Mammalian Telomeres',

- Annual Review of Genetics*, 42(1), pp. 301–334. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.
82. Pâques, F. and Haber, J. E. (1999) 'Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 63(2), pp. 349–404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98970/>.
83. Paull, T. T. and Gellert, M. (1998) 'The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks', *Molecular Cell*. Elsevier, 1(7), pp. 969–979. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80097-0.
84. Perner, S. *et al.* (2003) 'Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 163(5), pp. 1751–1756. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63534-1.
85. Pfeiffer, P. *et al.* (2004) 'Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations', *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1–4), pp. 7–13. doi: 10.1159/000077460.
86. Pickett, H. A. *et al.* (2009) 'Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles', *The EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 28(7), pp. 799–809. doi: 10.1038/emboj.2009.42.
87. Pickett, H. A. and Reddel, R. R. (2015) 'Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 22, p. 875. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3106>.
88. Prakash, R. *et al.* (2009) 'Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination', *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 23(1), pp. 67–79. doi: 10.1101/gad.1737809.
89. Rajavel, M., Mullins, M. R. and Taylor, D. J. (2014) 'Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance', *Biochimica et biophysica acta*, 1844(9), pp. 1550–1559. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.04.014.

90. Raji, H. and Hartsuiker, E. (2006) 'Double-strand break repair and homologous recombination in *Schizosaccharomyces pombe*', *Yeast*. Wiley-Blackwell, 23(13), pp. 963–976. doi: 10.1002/yea.1414.
91. Reddel, R. R. (2003) 'Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer', *Cancer Letters*, 194(2), pp. 155–162. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00702-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00702-4).
92. Rizki, A. and Lundblad, V. (2001) 'Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 411, p. 713. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35079641>.
93. Roumelioti, F. *et al.* (2016) 'Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication', *EMBO Reports*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 17(12), pp. 1731–1737. doi: 10.15252/embr.201643169.
94. Sakellariou, D. *et al.* (2013) 'Alternative Lengthening of Telomeres: Recurrent Cytogenetic Aberrations and Chromosome Stability under Extreme Telomere Dysfunction', *Neoplasia (New York, N.Y.)*. Neoplasia Press Inc., 15(11), pp. 1301–1313. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858894/>.
95. San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008) 'Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews, 77(1), pp. 229–257. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
96. Sfeir, A. and Symington, L. S. (2015) 'Microhomology-mediated end joining: a backup survival mechanism or dedicated pathway?', *Trends in biochemical sciences*, 40(11), pp. 701–714. doi: 10.1016/j.tibs.2015.08.006.
97. Shay, J. W. and Bacchetti, S. (1997) 'A survey of telomerase activity in human cancer', *European Journal of Cancer*. Elsevier, 33(5), pp. 787–791. doi: 10.1016/S0959-8049(97)00062-2.
98. Shay, J. W. and Wright, W. E. (2000) 'Hayflick, his limit, and cellular ageing', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Macmillan Magazines Ltd., 1, p. 72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35036093>.
99. Smogorzewska, A. *et al.* (2002) 'DNA Ligase IV-Dependent NHEJ of Deprotected Mammalian Telomeres in G1 and G2', *Current Biology*. Elsevier, 12(19), pp. 1635–1644. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01179-X.

100. Sobinoff, A. P. and Pickett, H. A. (2017) 'Alternative Lengthening of Telomeres: DNA Repair Pathways Converge', *Trends in Genetics*. Elsevier, 33(12), pp. 921–932. doi: 10.1016/j.tig.2017.09.003.
101. Sotiriou, S. K. *et al.* (2016) 'Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks', *Molecular cell*. Cell Press, 64(6), pp. 1127–1134. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.038.
102. van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (1998) 'TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions', *Cell*. Elsevier, 92(3), pp. 401–413. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80932-0.
103. Sugiyama, T. and Kowalczykowski, S. C. (2002) 'Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation', *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp. 31663–31672. doi: 10.1074/jbc.M203494200.
104. Sun, W. *et al.* (2008) 'The FANCM Ortholog Fml1 Promotes Recombination at Stalled Replication Forks and Limits Crossing Over during DNA Double-Strand Break Repair', *Molecular Cell*. Cell Press, 32(1–24), pp. 118–128. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.024.
105. Symington, L. S. (2014) 'End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6(8), p. a016436. doi: 10.1101/cshperspect.a016436.
106. Symington, L. S. and Gautier, J. (2011) 'Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice', *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, 45(1), pp. 247–271. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.
107. Symington, L. S., Rothstein, R. and Lisby, M. (2014) 'Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*. Genetics Society of America, 198(3), pp. 795–835. doi: 10.1534/genetics.114.166140.
108. Szostak, J. W. *et al.* (1983) 'The double-strand-break repair model for recombination', *Cell*. Elsevier, 33(1), pp. 25–35. doi: 10.1016/0092-8674(83)90331-8.
109. Truong, L. N. *et al.* (2013) 'Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA

- double-strand breaks in mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(19), pp. 7720–7725. doi: 10.1073/pnas.1213431110.
110. WATSON, J. D. (1972) 'Origin of Concatemeric T7DNA', *Nature New Biology*. Nature Publishing Group, 239(94), pp. 197–201. doi: 10.1038/newbio239197a0.
111. Williams, S. C. P. (2013) 'No end in sight for telomerase-targeted cancer drugs', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 19, p. 6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm0113-6>.
112. Wynford-Thomas, D. and Kipling, D. (1997) 'The end-replication problem', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 389, p. 551. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/39210>.
113. Yi, X. *et al.* (1999) 'Both Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms Regulate Human Telomerase Template RNA Levels', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 19(6), pp. 3989–3997. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104358/>.
114. Zakian, V. A. (1995) 'Telomeres: Beginning to Understand the End', *Science*, 270(5242), p. 1601 LP-1607. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/270/5242/1601.abstract>.
115. Zakian, V. A. (2012) 'Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes', *Experimental Cell Research*, 318(12), pp. 1456–1460. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.015.
116. Zellweger, R. *et al.* (2015) 'Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells', *The Journal of Cell Biology*, 208(5), p. 563 LP-579. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/208/5/563.abstract>.
117. Zeman, M. K. and Cimprich, K. A. (2014) 'Causes and consequences of replication stress', *Nature cell biology*, 16(1), pp. 2–9. doi: 10.1038/ncb2897.
118. Zhao, Y. *et al.* (2008) 'Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 36(3), pp. e14–e14. doi: 10.1093/nar/gkm1063.
119. Zhong, Z. H. *et al.* (2007) 'Disruption of telomere maintenance by depletion of

the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres', *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), pp. 29314–29322. doi: 10.1074/jbc.M701413200.