



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη του ρόλου των επιγενετικών και
επιδιορθωτικών μηχανισμών στη ρύθμιση
της γονιδιακής έκφρασης**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Λιάκος Αναστάσιος

Βιολόγος, MSc

Αθήνα 2020

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202)»

«Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.»

Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Παπαζαφείρη Παναγιώτα (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ
Ευθυμιόπουλος Σπύρος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ
Φουστέρη Μαρία, Ερευνήτρια Β', ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Τα μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ
Ευθυμιόπουλος Σπύρος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ
Φουστέρη Μαρία, Ερευνήτρια Β', ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»
Λυγερού Ζωή, Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
Ταραβήρας Σταύρος, Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ
Χατζής Παντελής, Ερευνητής Β', ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Η παρούσα διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Έρευνας (European Research Council (ERC), Agreement-309612) και από τη δράση «ΑΡΙΣΤΕΙΑ Ι»



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κύτταρα μας εκτίθενται καθημερινά σε μια πληθώρα παραγόντων που απειλούν την γονιδιωματική τους ακεραιότητα. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν μηχανισμοί, οι οποίοι εγγυώνται την ανίχνευση και την επιδιόρθωση των διαφόρων τύπων βλαβών που προκαλούνται στο DNA, μειώνοντας ταυτόχρονα την πιθανότητα εμφάνισης μεταλλαγών. Οι βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, επιδιορθώνονται από τον μηχανισμό εκτομής βάσης (Nucleotide Excision Repair, NER), ο οποίος αποτελείται από 2 υπό-μονοπάτια: το Global Genome NER (GG-NER ή GGR), το οποίο δρα σε όλο το γονιδίωμα και το Transcription Coupled NER (TC-NER ή TCR), το οποίο δρα στις ενεργώς μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδιώματος και πυροδοτείται από το σταμάτημα της RNA πολυμεράσης II (Pol II) στις περιοχές των UV επαγόμενων βλαβών, υποδηλώνοντας πως η μεταγραφή μέσω της Pol II διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας.

Με την εισαγωγή των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) βρέθηκε πως τα κύτταρα ανταποκρίνονται στο γενεοτοξικό στρες, μέσω μιας πολυεπίπεδης μεταγραφικής αναδιοργάνωσης, η οποία συντελεί στη γρήγορη επιδιόρθωση των UV επαγόμενων βλαβών. Ωστόσο, πολλές λεπτομέρειες του συγκεκριμένου μηχανισμού παρέμειναν αδιευκρίνιστες.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της UV ακτινοβολίας στην προσβασιμότητα της χρωματίνης, με τη βοήθεια της μεθόδου ATAC-seq. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν μη ακτινοβολημένοι (NO UV) και ακτινοβολημένοι (+UV) ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος (VH10-htert). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η έκθεση σε UV οδηγεί σε σημαντική αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης σε όλες τις ενεργώς μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδιώματος. Η αύξηση αυτή συνάδει με την UV-επαγόμενη απελευθέρωση των μορίων Pol II-ser2P από τις θέσεις παύσης της μεταγραφής πλησίον του υποκινητή (Promoter Proximal Pause, PPP) και λαμβάνει χώρα, όχι μόνο στα ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια, αλλά και στις μεταγραφικά ενεργές αλλά μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, όπως τα ενεργά μετάγραφα ανοδικά του υποκινητή (Promoter Upstream Transcripts (PROMPTs)) και οι ενεργοί ενισχυτές. Επιπλέον, πειράματα αλληλούχισης ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq) σε συνδυασμό με βιοχημικές τεχνικές έδειξαν ότι υπάρχει άμεσος συσχετισμός μεταξύ της αύξησης της προσβασιμότητας της χρωματίνης και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, η οποία παραμένει σε σταθερά επίπεδα στις περιοχές των σημείων έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Sites, TSS). Αντίστοιχα, δεν βρέθηκε καμία αλλαγή στο πρότυπο πρόσδεσης των EZH2 και H3K27me3 πριν και μετά την έκθεση σε UV. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι, οι υποκινητές των μεταγραφόμενων γονιδιωματικών περιοχών διατηρούν την ενεργότητά τους μετά από έκθεση σε UV.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων CHIP-seq και Western-Blot που πραγματοποιήθηκαν σε μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα κύτταρα, παρουσία αναστολέων διαφόρων σταδίων της μεταγραφής και τα οποία έδειξαν πως η ακτινοβολήση με UV δεν αναστέλλει την πρόσδεση των μορίων Pol II-hygro στις περιοχές TSS των ενεργώς μεταγραφόμενων γενετικών τόπων, αλλά προκαλεί μια εξαιρετικά γρήγορη μετάβαση από το στάδιο έναρξης σε αυτό της επιμήκυνσης της μεταγραφής, οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων της Pol II-hygro στους υποκινητές. Ακόμη, διαπιστώθηκε πως η διαδικασία πρόσδεσης-γρήγορης προώθησης λαμβάνει χώρα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ανάκαμψης μετά την έκθεση των κυττάρων σε UV και, επιβεβαιώθηκε πως κατά τη διαδικασία αυτή, τα μόρια Pol II διατηρούν την δυνατότητα να συνθέτουν start-RNAs, μόρια RNA που συντίθενται από την Pol II από το TSS μέχρι το σημείο PPP. Στο ίδιο πλαίσιο, παρατηρήθηκε πως το σήμα του νεοσυντιθέμενου RNA (nascent RNA, nRNA) στις περιοχές πλησίον του TSS, αυξάνει μετά την έκθεση σε UV. Επιπλέον, βιοπληροφορική συσχέτιση των δεδομένων μας με δεδομένα αλληλούχισης, τα οποία χαρτογραφούν σε γονιδιωματικό επίπεδο τα τμήματα του DNA που περιέχουν βλάβες και επιδιορθώνονται μέσω TC-NER (XR-seq), έδειξε πως για την επιτυχή ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης και την εξασφάλιση της ακεραιότητας όλου του μεταγραφόμενου γονιδιώματος, απαιτείται συνεχής τροφοδότηση των ενεργών ρυθμιστικών περιοχών, με νέα μόρια Pol II.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της διατριβής αυτής έδειξαν πως, η αύξηση της προσβασιμότητας και η διατήρηση ενεργής κατάστασης της χρωματίνης στα TSS των γονιδίων, ενισχυτών και PROMPTS μετά την έκθεση σε UV, ευνοεί την πρόσδεση μορίων Pol II στις TSS περιοχές και τη γρήγορη προώθησή τους στη φάση επιμήκυνσης, τροφοδοτώντας ένα μεταγραφικό κύμα, το οποίο σαρώνει το ενεργώς μεταγραφόμενο γονιδίωμα ανιχνεύοντας και επιδιορθώνοντας τις UV επαγόμενες βλάβες.

Παράλληλα, μελετήθηκαν οι δυναμικές έναρξης της μεταγραφής μετά από έκθεση σε UV σε κύτταρα ινοβλαστών δέρματος ασθενών CS-B. Τα πειράματά μας έδειξαν πως η πρόσδεση της Pol II στις περιοχές των υποκινητών των ενεργών γονιδίων δεν αναστέλλεται μετά από έκθεση σε UV και πως η τροποποίηση H3K27ac παραμένει σε σταθερά επίπεδα στις περιοχές αυτές. Τα συγκεκριμένα δεδομένα υποδηλώνουν πως η ανικανότητα επανεκκίνησης της μεταγραφής στους ινοβλάστες CS-B, δεν οφείλεται σε μόνιμη αναστολή της μεταγραφικής έναρξης αλλά στην αδυναμία διαχείρισης του σταματήματος της μεταγραφικής επιμήκυνσης στις περιοχές των βλαβών. Τέλος, βρέθηκε πως σε αρκετά διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια μεταξύ μη ακτινοβολημένων φυσιολογικών και CS-B ινοβλαστών δέρματος, τα οποία σχετίζονται με τις διαδικασίες της ανάπτυξης και διαφοροποίησης, παρουσιάζονται αντίστοιχα μεγάλες διαφορές στο πρότυπο στόχευσης από την τροποποίηση H3K27me3. Τα παραπάνω συνδέουν την πρωτεΐνη CSB με τις διαδικασίες της ορθής επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

SUMMARY

The integrity of the DNA sequence is constantly challenged by a variety of genotoxic perturbations. A plethora of DNA Damage Response (DDR) mechanisms have evolved to guarantee the detection and removal of different types of DNA lesions, limiting the probability of mutagenesis. Nucleotide Excision Repair (NER), via its two subpathways, plays a vital role in sensing and removing a large panel of helix-distorting DNA adducts induced by ultraviolet (UV) light, cigarette smoke, and other chemicals currently used in chemotherapy. Global Genome-NER (GG-NER, GGR) operates through the entire genome and is triggered stochastically by helix distortions, while Transcription Coupled-NER (TC-NER, TCR) is triggered by elongating Pol II molecules encountering DNA adducts and speeds-up damage excision and repair in expressed loci, revealing that transcription is a major driving force in safeguarding genomic stability.

Recent advances in high-throughput genome-wide methodologies have revealed that cells cope with DNA damage-induced stress through a multilayered transcription-driven response that involves global alteration of the gene expression program and leads to accelerated repair of transcription-blocking DNA lesions. Nonetheless, the associated molecular events ruling these processes remain elusive.

By focusing on normal human skin fibroblasts, we uncovered a surprising gain in chromatin accessibility at virtually all active Transcription Start Sites (TSSs) of mRNAs, PROMoter uPstream Transcripts (PROMPTs) and enhancers in response to UV irradiation. This phenomenon is accompanied by the maintenance of active histone marks (H3K27ac) and the lack of deposition of transcriptional silencing modifications (H3K27me3) at the respective transcribed loci. Importantly, we revealed the continuous and dynamic recruitment of pre-initiating RNA Polymerase II (Pol II-hypo) at active TSSs and its unrestrained transition into initiation at these regulatory loci, as further demonstrated by the increased synthesis of start-RNAs and the production of high levels of nascent RNAs (nRNAs) proximal to TSS sites, upon genotoxic stress. This molecular machinery feeds a widespread promoter-proximal pause release of elongating Pol II waves and maximizes DNA repair activity regardless of prior-to-UV transcription level. Our data highlight a dynamic synergy between increased accessibility of proximal and distal transcription regulatory regions and an unanticipated constant initiation process that is unleashed by the UV-triggered release of Pol II molecules from promoter-proximal pause sites. This mechanism secures gene expression accuracy and preserves the integrity of essentially all active transcription regulatory regions.

In parallel, we studied the transcription initiation dynamics upon UV stress in CS-B fibroblasts, a cellular model characterized by its inability to restore transcription upon exposure to UV stress. Surprisingly, we observed that in CS-B cells H3K27ac is not significantly altered and de novo binding of Pol II-hypo is not inhibited at active TSSs, early after exposure to UV. Furthermore, similar to normal skin fibroblasts, the promoter-proximal pause release of Pol II governs the transcription reorganization upon genotoxic stress exposure. Overall, our findings unravel mechanistic insights into the transcription response to UV, in both

normal and CS-B fibroblasts, indicating that i) in normal skin fibroblasts continuous engagement of Pol II molecules into transcription from TSS sites enables the scanning of the totality of transcribed genome, and ii) transcription initiation is not inhibited in CS-B cells at least at the early post recovery times, suggesting that the inability to restore transcription in these cells derives from aberrations in the way cells handle transcription elongation blockage.

Moreover, we noticed that, in non-irradiated cells, a group of genes implicated in developmental processes was differentially expressed between normal and CS-B skin fibroblasts while also being differentially targeted by H3K27me3. These results indicate that CSB protein could act as an epigenetic regulator and provide possible links between the phenotype and the molecular basis of Cockayne Syndrome.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στον όλο και πιο ανταγωνιστικό, απαιτητικό και ιδιαίτερο κλάδο των βιοεπισημών, η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής αποτελεί ένα ταξίδι γνώσης, αλλά και μια δοκιμασία που ενδεχομένως μόνο όσοι τα έχουν ζήσει μπορούν να καταλάβουν. Απαιτείται σκληρή δουλειά, υπομονή και επιμονή, δύναμη ψυχική και πίστη στον εαυτό σου για την αναμέτρηση με τις όποιες αποτυχίες και δυσκολίες, που αναπόφευκτα θα προκύψουν. Φθάνοντας λοιπόν στο τέλος της διδακτορικής διατριβής, αυτό που με βεβαιότητα θα μπορούσα να πω, στον εαυτό μου πρωτίστως, αναλογιζόμενος όλη την πορεία και τις διάφορες διακυμάνσεις μέσα σε αυτήν, είναι πως ο δρόμος ίσως να υπήρξε μακρύς, η «Ιθάκη» όμως σίγουρα άξιζε τον κόπο. Σε μια τέτοια διαδρομή, ωστόσο, ποτέ δεν είσαι μόνος σου, για αυτό και οφείλω να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους εκείνους που βοήθησαν πολύ ή λίγο και που στάθηκαν δίπλα μου, στην πορεία αυτή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ Μαρία Φουστέρη. Η Μαρία, ήταν πάντα εκεί όλα αυτά τα χρόνια, καθοδηγώντας, ενθαρρύνοντας ιδέες και προσπάθειες, πάντα αισιόδοξη και εκπέμποντας θετική ενέργεια. Μου έδωσε την ευκαιρία να εκπαιδευτώ σε σύγχρονα «εργαλεία» της Βιολογίας, μέσα σε ένα περιβάλλον που ευνοούσε τη συνύπαρξη και αλληλεπίδραση επιστημόνων με διαφορετικές εξειδικεύσεις.

Ένα επίσης μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, Δρ Παναγιώτα Παπαζαφείρη. Η βοήθειά της υπήρξε μεγάλη, όσο και το ενδιαφέρον της για την επιστημονική πρόοδό μου. Θέλω να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την επιμέλεια με την οποία διόρθωσε το κείμενο της διατριβής και για τις προτάσεις της, οι οποίες θεωρώ πως βελτίωσαν κατά πολύ την ποιότητα του κειμένου. Μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ Σπύρο Ευθυμίου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διατριβής μου, ο οποίος παρακολούθη τα επιστημονικά βήματά μου, από τότε που υπήρξα διπλωματικός προπτυχιακός φοιτητής στο εργαστήριό του. Οι συμβουλές του πάντα είναι πολύτιμες και ξεχωριστή για μένα είναι η αγάπη που μεταδίδει για την επιστήμη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Δρ Παντελή Χατζή, μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της διατριβής. Με τον Παντελή και την ερευνητική του ομάδα συνυπήρξαμε όλα αυτά τα χρόνια στο «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και είχαμε μια εξαιρετική συνεργασία. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Δρ Διαμάντη Σίδηρη, Δρ Σταύρο Ταραβήρα, και Δρ Ζωή Λυγερού για τη συμβολή τους, ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Δρ Μαρίας Φουστέρη, με τους οποίους συνυπήρξαμε όλα αυτά τα χρόνια. Τον Matthieu, τον Γιώργο, την Eszter, τον Γιάννη, την Κατερίνα, τη Ζωή, τη Σμαράγδα, τον Δημήτρη και την Φωτεινή. Στο εργαστήριο ζούσαμε σαν μια μικρή οικογένεια και

σε αυτό συνέβαλλε καθένας από την πλευρά του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να δώσω στον Δρ Matthieu Lavigne, για την εξαιρετική μας συνεργασία, την επίβλεψη, τις άπειρες επιστημονικές συζητήσεις που απολάμβανα και την συμβολή του στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου αντίληψης. Ακόμη, να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Κωνσταντόπουλο για την βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων και τις εποικοδομητικές μας συζητήσεις, σχετικά με αυτήν. Για τον Γιώργο, τον Δημήτρη και τη Σμαράγδα θα πω πως παρόλο που είναι ασυνήθιστο να κάνεις φίλους σε αυτόν τον χώρο, νομίζω τα καταφέραμε.

Τέλος, να ευχαριστήσω τη Βίκη και τον Αλέξανδρο, καθώς και τον Δρ Μιχάλη Βερυκοκάκη και την ερευνητική του ομάδα, για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήσαμε στο χώρο του εργαστηρίου και την καθημερινή αλληλοβοήθεια στα μικρά ή μεγάλα προβλήματα που προέκυπταν.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους πιο δικούς μου ανθρώπους. Στην Δήμητρα, για την υποστήριξη, την ηρεμία, το κουράγιο και την αισιοδοξία που έχει το χάρισμα να μεταδίδει στους ανθρώπους γύρω της. Θέλω να της πω, πως μας περιμένουν ακόμη πιο σημαντικά και ακόμη πιο μεγάλα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια ανιδιοτελώς και που από μικρό παιδί μου έδειξαν την αξία της μόρφωσης, της παιδείας και της γνώσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
SUMMARY	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
1 Κατάλογος Συντομογραφιών.....	12
2 Εισαγωγή	14
2.1 Βλάβες στο DNA και επιδιορθωτικοί μηχανισμοί.....	14
2.2 Μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων.....	15
2.2.1 Τύπος βλαβών που επιδιορθώνεται από τον μηχανισμό εκτομής νουκλεοτιδίου	15
2.2.2 Μοριακά μονοπάτια.....	18
2.2.3 NER και χρωματίνη	20
2.3 Σύνδρομα που σχετίζονται με έλλειψη λειτουργικού μηχανισμού NER	21
2.3.1 Μελαχρωματική Ξηροδερμία.....	21
2.3.2 Σύνδρομο Cockayne	22
2.3.3 Συνδυαστικός φαινότυπος Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας / Συνδρόμου Cockayne	23
2.3.4 Σύνδρομο Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας με νευρολογική ασθένεια.....	23
2.3.5 Σύνδρομο ευαισθησίας σε υπεριώδη ακτινοβολία	23
2.3.6 Τριχοθειοδυστροφία	23
2.3.7 Εγκεφαλο-οπτικο-προσωπο-σκελετικό Σύνδρομο	24
2.3.8 Κλινική ετερογένεια και επεξήγηση	24
2.4 Μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης II	26
2.4.1 Ο κύκλος της μεταγραφής και ο CTD κώδικας	26
2.4.2 Μη κωδική μεταγραφή	29
2.5 Χρωματίνη και Μεταγραφή	31
2.5.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών και μεταγραφή	33
2.5.2 Προσβασιμότητα της χρωματίνης και μεταγραφή	38
2.5.3 UV ακτινοβολία και μεταγραφή.....	39
3 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	45
4 Υλικά και Μέθοδοι	47
4.1 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών	47
4.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυτταρικών σειρών.....	47
4.3 Απομόνωση ιστονών	48
4.4 Διασύνδεση DNA - πρωτεϊνών με φορμαλδεΰδη (<i>In vivo</i> crosslinking)	49
4.5 Κυτταρομετρία ροής.....	49

4.6	Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).....	49
4.7	Δοκιμασία αλληλούχισης χρωματίνης προσβάσιμης από τρανσποζάση.....	52
4.8	Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και στύπωμα Western.....	56
4.9	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	58
4.10	Κατασκευή βιβλιοθηκών συμβατές με αλληλούχιση νέας γενιάς.....	59
4.10.1	Δημιουργία «τυφλών» άκρων:.....	60
4.10.2	Προσθήκη αδερίνης στο 3' ελεύθερο άκρο:.....	61
4.10.3	Προσθήκη ειδικών προσαρμογέων.....	61
4.10.4	Απομόνωση DNA επιλογή μεγεθών 150bp-500bp.....	62
4.10.5	Ενίσχυση βιβλιοθηκών μέσω PCR.....	63
4.11	Ανάλυση και Υπολογισμός του Δείκτη Διαφυγής από τον Υποκινητή.....	65
4.12	Λειτουργική ταξινόμηση γονιδίων και ενισχυτών σε Vh10 κύτταρα.....	65
4.13	Απομόνωση ολικού RNA.....	67
4.14	Απομόνωση και qPCRs των start-RNAs.....	68
5	Αποτελέσματα.....	70
5.1	Αναδιοργάνωση των ισομορφών της Pol II ως απόκριση στη UV ακτινοβολία.....	70
5.2	Η προσβασιμότητα της χρωματίνης αυξάνει μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία.....	72
5.3	Μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της χρωματίνης ως απόκριση στην έκθεση σε UV ακτινοβολία.....	77
5.3.1	Η ακτινοβολία δεν αλλάζει τα πρότυπα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων H3K27ac και H3K27me3, σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος.....	77
5.3.2	Επίδραση της UV ακτινοβολίας στο πρότυπο και τα επίπεδα της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης H3K79me2, σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος.....	80
5.4	Μετάβαση της Pol II στη φάση επιμήκυνσης σε όλους τους μεταγραφόμενους γονιδιωματικούς τόπους.....	82
5.5	Αναστολή της μεταγραφικής επιμήκυνσης με DRB, επαναφέρει τα επίπεδα της Pol II-hypo, μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία.....	86
5.5.1	Πειράματα μελέτης των δυναμικών της μεταγραφικής έναρξης ως απόκριση στη UV ακτινοβολία, σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος.....	86
5.5.2	Πειράματα μελέτης των δυναμικών της μεταγραφικής έναρξης ως απόκριση στην UV ακτινοβολία, σε ινοβλάστες δέρματος CS-B.....	90
5.6	Αυξημένη σύνθεση νεοσυντιθέμενου RNA στα TSS των γονιδίων, των PROMPTs, και των eTSS μετά την έκθεση σε UV.....	94
5.7	Αντίστοιχα επίπεδα Pol II-hypo στις θέσεις PIC συντελούν σε ομοιόμορφο TC-NER.....	99

5.8	Η συνεχής μεταγραφική έναρξη τροφοδοτεί και μεγιστοποιεί την επιδιόρθωση μέσω TC-NER 103	
5.9	Συσχέτιση μεταξύ επιγενετικών ρυθμίσεων και διαφορών της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ Vh10 και CS-B κυττάρων	108
6	Συζήτηση.....	112
7	Βιβλιογραφία.....	118
	Βιογραφικό Σημείωμα.....	131
	Παράρτημα Ι – Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά	134

1 Κατάλογος Συντομογραφιών

6,4-PP	6,4- Photoproducts
ARR	Access Repair Restore
AR	Accessible Region
ATAC	Assay for Transposase Accessible Chromatin
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM and Rad3 Related
BER	Base Excision Repair
CAGE	Cap Analysis Gene Expression
CTD	Carboxy-Terminal Domain
COFS	Cerebro-oculo-facio-skeletal Syndrome
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CS	Cockayne Syndrome
CSA	Cockayne Syndrome A protein
CSB	Cockayne Syndrome B protein
CPD	CycloButane Pyrimidine Dimers
DAR	Differentially Accesible Region
DEG	Differentially Expressed Gene
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
DDR	DNA Damage Response
DSB	Double Strand Breaks
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGTA	Egtazic Acid
eRNA	enhancer RNA
eTSS	enhancer TSS
EI	Escape Index
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
XR-seq	Exision Repair sequencing
FBS	Fetal Bovine Serum
GTF	General Transcription Factor
GRO-seq	Genomic run-on sequencing
GG-NER/GGR	Global Genome Nucleotide Excision Repair
HAT	Histone Acetyl Transferase
HDACs	Histone Deacetylases
HR	Homologous Recombination
h-tert	Human Telomerase Reverse Transcriptase
mRNA	messenger RNA
MMR	Mismatch Repair
nRNA	nascent RNA
NELF	Negative Elongation Factor
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non Homologous End Joining
NDR	Nucleosome Depleted Region
NER	Nucleotide Excision Repair

PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PBS	Phosphate Buffer Saline
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PIC	pre-initiation complex
PPP	Promoter Proximal Pause
PROMPT	Promoter Upstream Transcript
PI	Propidium Iodide
ROS	Reactive Oxygen Species
rRNA	ribosomal RNA
RNAPII/Pol II	RNA Polymerase II
SV	Simian Virus
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TC-NER/TCR	Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair
TF	Transcription Factor
TSS	Transcription Start Site
tRNA	transfer RNA
TTD	Trichothiodystrophy
UV	Ultraviolet
UVSS	UV Sensitive Syndrome
XP	Xeroderma Pigmentosum

2 Εισαγωγή

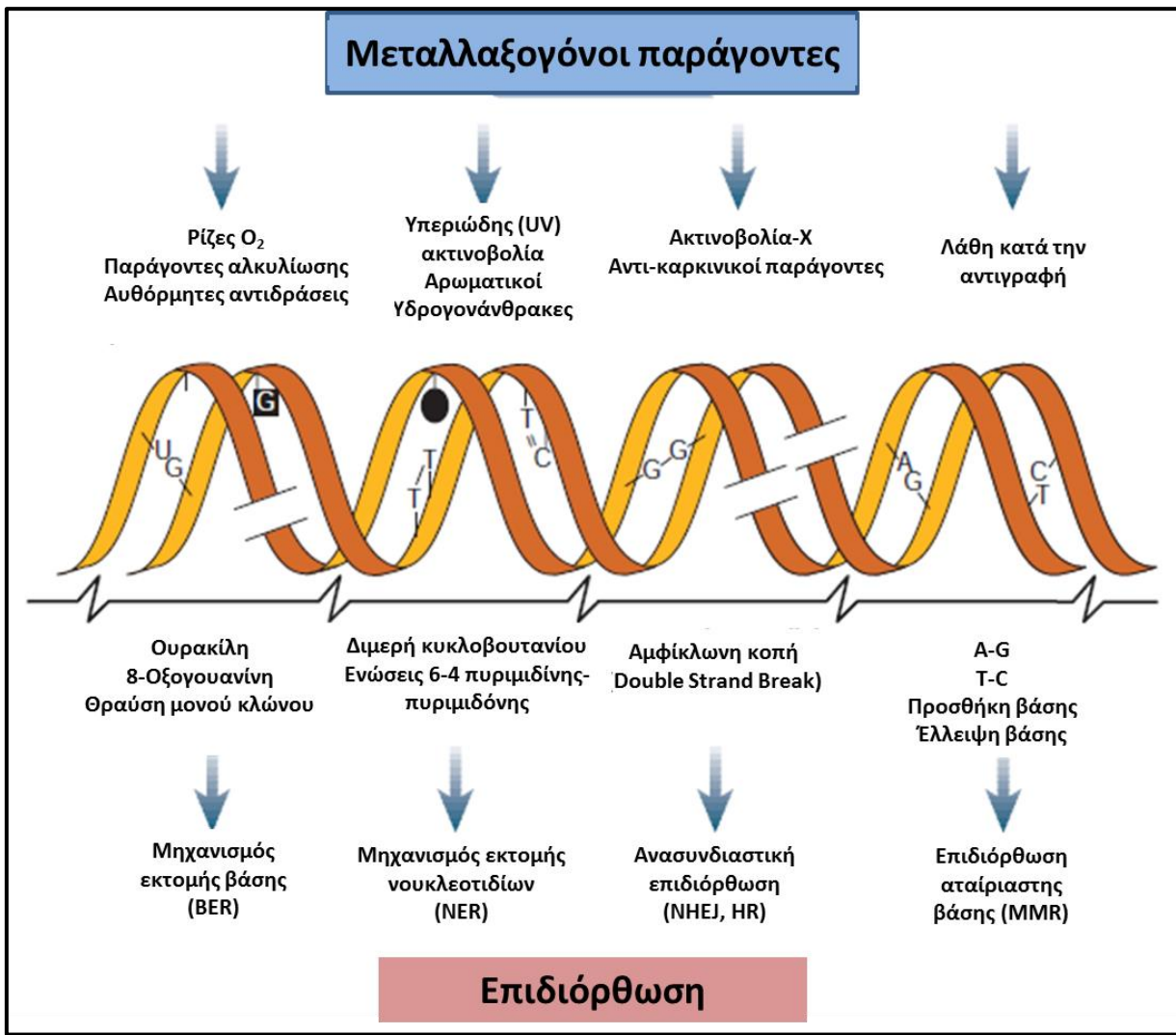
2.1 Βλάβες στο DNA και επιδιορθωτικοί μηχανισμοί

Οι βλάβες στο γενετικό υλικό μπορούν να αποδοθούν σε τρεις κύριους παράγοντες. Πρώτον, εξωγενείς παράγοντες όπως η υπεριώδης (Ultraviolet, UV) ακτινοβολία, η ιοντίζουσα ακτινοβολία και οι ακτίνες X, προκαλούν αλλαγές στη δομή του DNA οι οποίες αν δεν επιδιορθωθούν, μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και μετέπειτα σε καρκίνο. Δεύτερον, βλάβες στο γενετικό υλικό μπορούν να προκαλέσουν παραπροϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) οι οποίες προέρχονται από αντιδράσεις του αερόβιου μεταβολισμού και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Τέλος, διάφοροι χημικοί δεσμοί στο DNA μπορούν να διασπαστούν αυθόρμητα, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις απαμινώσεων ή υδρολύσεων αζωτούχων βάσεων (Hoeijmakers 2001). Οι βλάβες στο γενετικό υλικό διαταράσσουν φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή, ενώ προκαλούν και σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου σε σημεία ελέγχου (checkpoints), ώστε να αποκατασταθούν, πριν μετατραπούν σε μεταλλάξεις.

Η πληθώρα των παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA αλλά και η ετερογένεια αυτών καθ' αυτών των βλαβών, οδήγησαν στην ανάπτυξη διαφορετικών επιδιορθωτικών μηχανισμών οι οποίοι προφυλάσσουν τη γενετική πληροφορία, συντελούν στη γονιδιωματική σταθερότητα και είναι εξελικτικά συντηρημένοι. Στα θηλαστικά υπάρχουν 4 διαφορετικοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί (Εικόνα 1): ο μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER), ο μηχανισμός εκτομής βάσης (Base Excision Repair, BER), η επιδιόρθωση αταίριαστης βάσης (Mismatch Repair, MMR) και η ανασυνδυαστική επιδιόρθωση (Recombinational Repair). Γενικά, ο μηχανισμός NER ανιχνεύει και επιδιορθώνει πολλές βλάβες οι οποίες διαταράσσουν τη δομή της διπλής έλικας (αναλύεται διεξοδικά παρακάτω). Από την άλλη, ο μηχανισμός BER επιδιορθώνει μικρές χημικές αλλαγές βάσεων. Συνήθως οι βλάβες που επιδιορθώνονται από τον NER προκαλούνται από εξωγενείς παράγοντες, ενώ ο BER επιδιορθώνει συνήθως βλάβες ενδογενούς προέλευσης (Hoeijmakers 2001). Η ανασυνδυαστική επιδιόρθωση (Recombinational Repair) μέσω των δύο μονοπατιών του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination, HR) και της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (Non-homologous end joining, NHEJ), επιδιορθώνει βλάβες στις οποίες και οι δύο κλώνοι του DNA επηρεάζονται (Double Strand Breaks, DSB). Τέλος, ο επιδιορθωτικός μηχανισμός MMR στοχεύει τις αταίριαστες βάσεις που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή καθώς και προσθήκες ή ελλείψεις βάσεων (Hoeijmakers 2001).

Αξίζει να σημειωθεί πως οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί που προαναφέρθηκαν λειτουργούν στο πλαίσιο ενός ευρύτερου συστήματος προστασίας του κυττάρου από δυνητικές βλάβες, το οποίο αναφέρεται ως Σηματοδότηση Απόκρισης σε Βλάβες του DNA (DNA Damage Response signaling, DDR). Μέσω της μοριακής σηματοδότησης του DDR, μπορούν να ενεργοποιηθούν μονοπάτια απόπτωσης, κυτταρικής

γήρανσης ή κυτταρικής επιβίωσης αλλά και να επηρεαστούν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί αυτοί καθαυτοί. Κυρίαρχο ρόλο στο σύστημα DDR διαδραματίζουν οι κινάσες ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και ATR (ATM and Rad3 related), οι οποίες φωσφορυλιώνοντας μια σειρά από πρωτεΐνες στόχους μεταδίδουν και ενισχύουν σήματα που είναι καθοριστικά για διαδικασίες όπως η επιδιόρθωση, η μεταγραφή και η αντιγραφή αλλά και για την μετέπειτα μοίρα των κυττάρων (Ciccia and Elledge 2010; Jeggo et al. 2016).



Εικόνα 1. Βλάβες στο γενετικό υλικό και επιδιορθωτικοί μηχανισμοί (τροποποίηση από Hoeijmakers 2001).

2.2 Μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων

2.2.1 Τύπος βλαβών που επιδιορθώνεται από τον μηχανισμό εκτομής νουκλεοτιδίου

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μηχανισμού εκτομής νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair, NER) αποτελεί το γεγονός πως συντελεί στην ανίχνευση και επιδιόρθωση μιας μεγάλης ποικιλίας

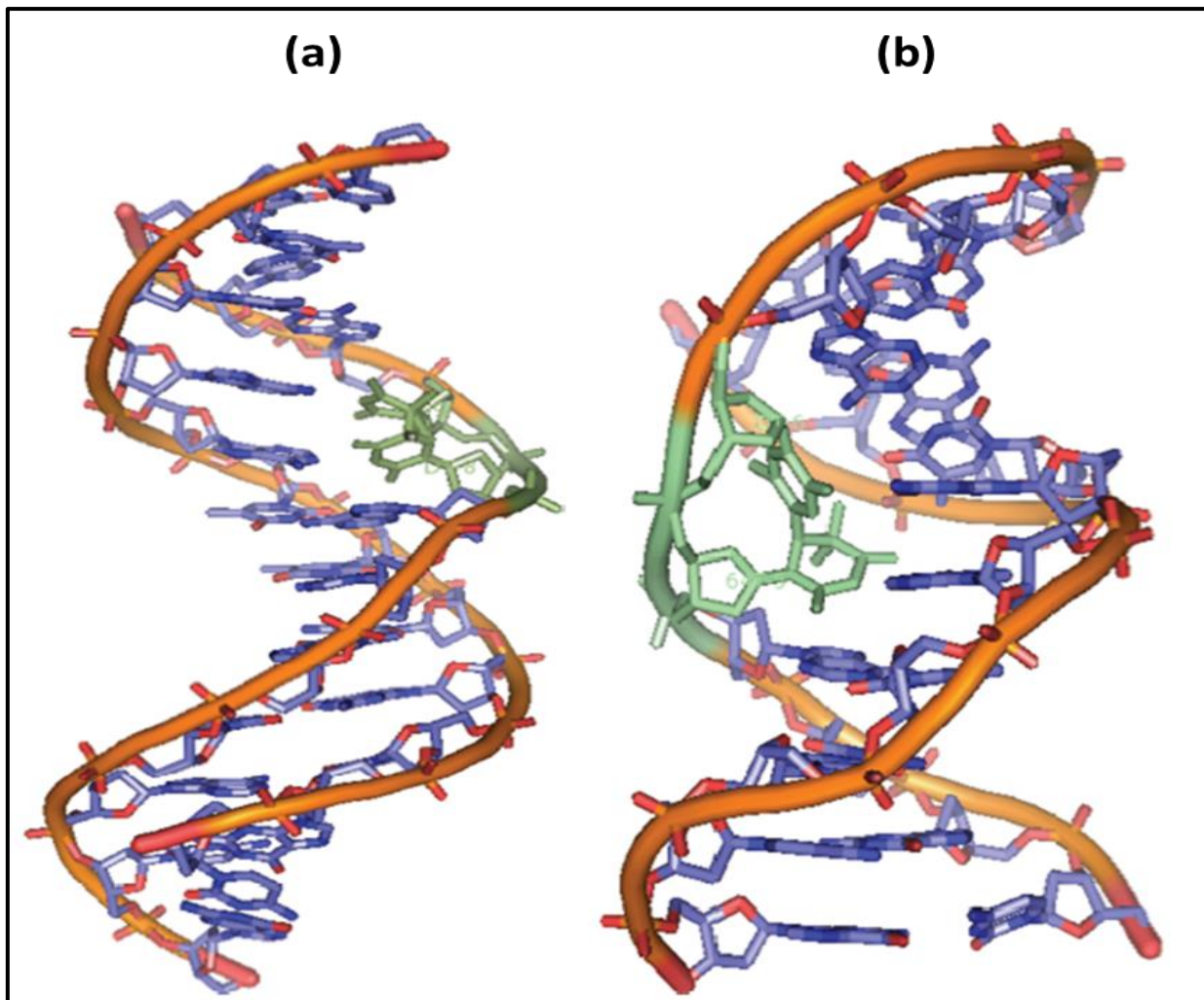
βλαβών στο DNA. Τέτοιες βλάβες μπορεί να προκαλούνται είτε από την UV ακτινοβολία, είτε από έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες. Ωστόσο, το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των βλαβών είναι πως είναι ογκώδεις και διαταράσσουν τη στερεοδομή της διπλής έλικας.

2.2.1.1 Βλάβες που προκαλούνται από UV ακτινοβολία

Είναι γνωστό πως η UV ακτινοβολία έχει ισχυρά επιβλαβή και μεταλλαξογόνο δράση. Η UV μπορεί να διαχωρισθεί με βάση το μήκος κύματος σε τρεις επιμέρους ακτινοβολίες: UVA (400-320nm), UVB (320-290nm) και UVC (290-200nm). Όσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος τόσο πιο δραστική είναι η ακτινοβολία, ωστόσο το στρώμα του όζοντος στην ατμόσφαιρα είναι ικανό να φιλτράρει τη UVC και τα μικρότερα μήκη κύματος της UVB. Από την άλλη πλευρά, λόγω του μεγάλου μήκους κύματος η UVA μπορεί να διεισδύσει πιο βαθιά στο δέρμα (Gillet and Schärer 2006).

Η UV μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων χημικών ενώσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων του DNA που ονομάζονται φωτοπροϊόντα. Αυτά μπορεί να είναι διμερή κυκλοβουτανίου (Cyclobutane Pyrimidine Dimers, CPDs) ή ενώσεις 6-4 πυριμιδίνης-πυριμιδόνης (6-4 Photoproducts, 6-PPs). Τα CPDs αποτελούν τα συχνότερα UV-επαγόμενα φωτοπροϊόντα. Σχηματίζονται μεταξύ γειτονικών TTs αλλά καθώς και μεταξύ γειτονικών TC, CT ή CC εξαρτημένου της δόσης και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Οι ενώσεις 6-4PPs αποτελούν τα δεύτερα πιο συχνά εμφανιζόμενα φωτοπροϊόντα, αφού αντιστοιχούν περίπου στο 25-30% των αντίστοιχα επαγόμενων CPDs. Με τη σειρά τους σχηματίζονται σε γειτονικά TC, CC και TT με αναλογίες που εξαρτώνται από το μήκος κύματος και τις γειτονικές γονιδιωματικές αλληλουχίες (Gillet and Schärer 2006).

Παρόλο που τα φωτοπροϊόντα που περιγράφηκαν παραπάνω προκαλούνται με αντίστοιχα μήκη κύματος UV ακτινοβολίας, οι παραμορφώσεις που προκαλούν στη διπλή έλικα του DNA είναι διαφορετικές. Τα CPDs οδηγούν σε μικρή κάμψη της έλικας χωρίς όμως να επηρεάζουν το ζευγάρι των βάσεων. Από την άλλη, οι ενώσεις 6-4 PPs προκαλούν κάμψη και ξετύλιγμα της έλικας οδηγώντας σε εκτεταμένη παραμόρφωση που οδηγεί σε απώλεια του ζευγαρώματος των βάσεων στην περιοχή της βλάβης (Εικόνα 2). Οι στερεοδομικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών ειδών φωτοπροϊόντων, έχουν άμεσο αντίκτυπο στην ανίχνευσή τους, αφού οι δομές 6-4PPs ανιχνεύονται ευκολότερα (Gillet and Schärer 2006).



Εικόνα 2. Τρισδιάστατες δομές της διπλής έλικας όταν σε αυτήν συναντώνται οι UV-επαγόμενες βλάβες (πράσινο) (α) CPDs και (b) 6,4PPs (τροποποίηση από Rastogi et al. 2010) .

2.2.1.2 Βλάβες που προκαλούνται από χημικούς παράγοντες

Ανάμεσα στις χημικές ενώσεις που προκαλούν βλάβες οι οποίες επιδιορθώνονται από τον NER, είναι το σύμπλοκο cis-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος(II), ευρύτερα γνωστό ως σισπλατίνη (cisplatin). Η σισπλατίνη χρησιμοποιείται σε χημειοθεραπείες έναντι πολλών τύπων καρκίνου (όρχεων, ωθηκών, κύστης, πνεύμονα). Ακόμη, έχει βρεθεί πως πυροδοτεί μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό θάνατο (Wang and Lippard 2005). Η κυτταροτοξικότητα της σισπλατίνης έγκειται στη δραστηριότητα του ατόμου λευκόχρυσου, το οποίο έχει τη δυνατότητα σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών με το N⁷ των πουρινών, σχηματίζοντας κυρίως 1,2- ή 1,3- χημικές διασυνδέσεις μεταξύ γειτονικών πουρινών. Οι δομές αυτές προκαλούν παραμόρφωση της διπλής έλικας και έτσι αναγνωρίζονται από τον μηχανισμό NER (Wang and Lippard 2005).

Άλλοι χημικοί παράγοντες που προκαλούν βλάβες-στόχους για τον μηχανισμό NER αποτελούν αρωματικοί υδρογονάνθρακες, όπως το βενζο{α}πυρένιο και το βενζο{c}φαινανθρένιο, που βρίσκονται στον καπνό του τσιγάρου, αλλά και αρυλαμίνες όπως πολυκυκλικές αρωματικές αμίνες που βρίσκονται

στον καπνό του τσιγάρου και στο μαγειρεμένο φαγητό. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με τη γουανίνη στο DNA, προκαλώντας τοπικές αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση της διπλής έλικας (Gillet and Schäfer 2006).

2.2.2 Μοριακά μονοπάτια

Ο μηχανισμός NER βασίζεται στη συντονισμένη δράση περισσότερων από 30 πρωτεϊνών. Δυο διαφορετικά μοριακά υπο-μονοπάτια δρουν ώστε ο μηχανισμός NER να είναι πλήρως λειτουργικός (Εικόνα 3). Το μονοπάτι που αναφέρεται διεθνώς ως Global Genome NER (GG-NER ή GGR) και το μοριακό μονοπάτι του Transcription Coupled NER (TC-NER ή TCR). Τα μονοπάτια αυτά μοιράζονται πολλές κοινές πρωτεΐνες, ενώ διαφέρουν ως προς τον μηχανισμό ανίχνευσης των βλαβών στο DNA, τις γονιδιωματικές περιοχές όπου δρουν αλλά και την ταχύτητα δράσης τους. Τα μοριακά αυτά μονοπάτια επιδιορθωθούν τις βλάβες που προκαλούνται στο γενετικό υλικό, από τους γενοτοξικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν (Κεφάλαιο 2.2.1) .

2.2.2.1 Ανίχνευση βλαβών

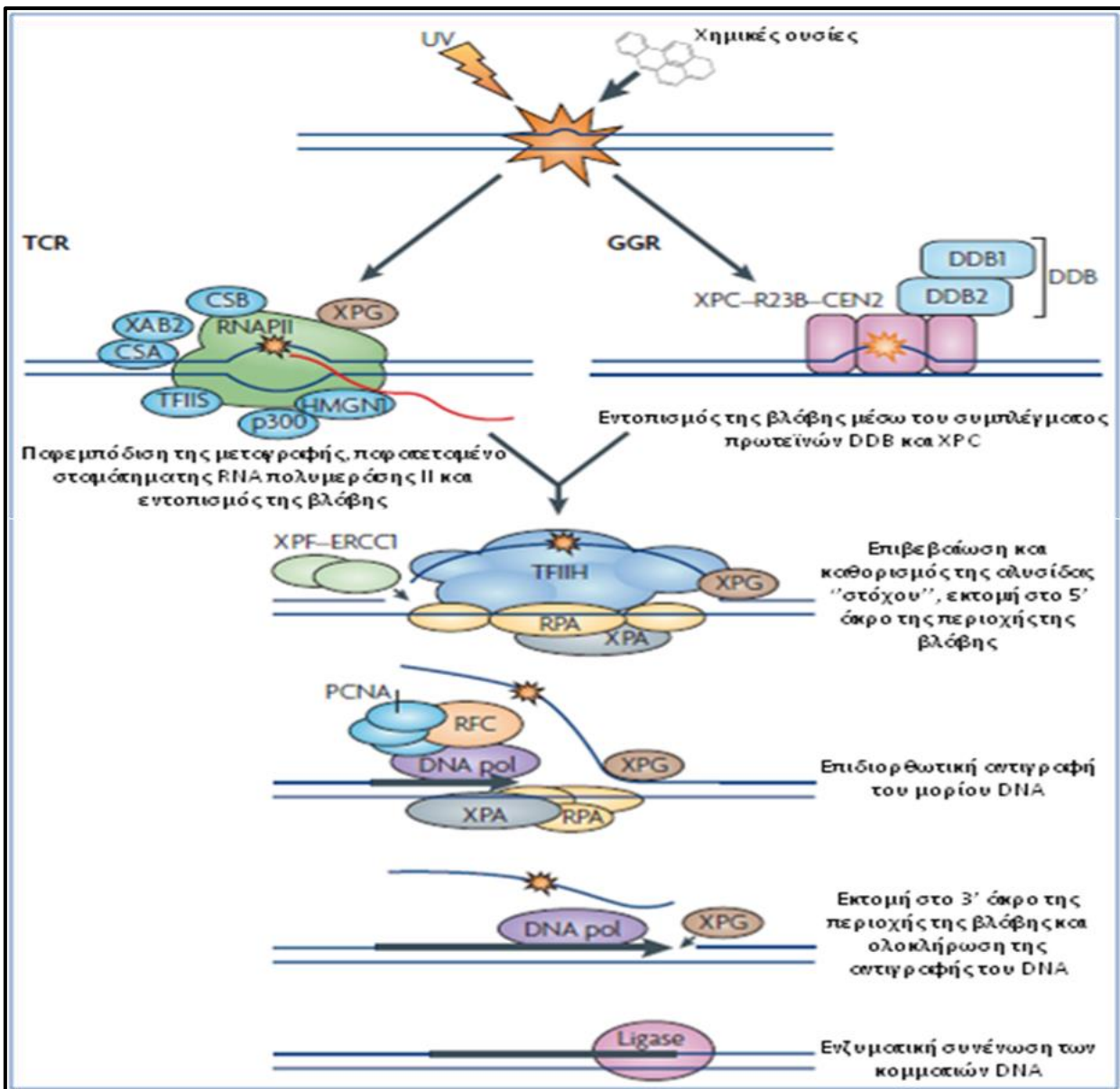
Όπως σε όλους τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, η ανίχνευση των βλαβών αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την μετέπειτα επιδιόρθωσή τους. Για τον μηχανισμό NER, ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός πως οι βλάβες δεν αναγνωρίζονται ως «επίτοποι» που θα αλληλεπιδράσουν ειδικά και θα προσδεθούν με το μόριο αναγνώρισης. Αντίθετα, τα μόρια αναγνώρισης μπορούν να ανιχνεύουν μια πληθώρα βλαβών οι οποίες, κατά κανόνα, διαταράσσουν την ορθή στερεοδομή της διπλής έλικας του DNA (Κεφάλαιο 2.2.1).

Ο μηχανισμός GG-NER δρα σε όλο το γονιδίωμα και ανιχνεύει τις βλάβες μέσω της στοχαστικής δράσης των πρωτεϊνών XPC-RAD23B ή UV-DDB1/2 (Marteijn et al. 2014). Από την άλλη πλευρά, ο μηχανισμός TC-NER δρα στα ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια και συγκεκριμένα σε βλάβες που βρίσκονται στη μεταγραφόμενη αλυσίδα αυτών, εξαιτίας του σταματήματος της RNA πολυμεράσης II (RNAPII ή Pol II) στις βλάβες αυτές οι οποίες οδηγούν στην πυροδότηση του TC-NER μηχανισμού (Vermeulen and Fooster 2013a), μέσω στρατολόγησης των πρωτεϊνών Cockayne Syndrome A (CSA) και Cockayne Syndrome B (CSB). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι απαραίτητες για την περαιτέρω στρατολόγηση των πρωτεϊνών του TC-NER μονοπατιού, όπως οι HMG1, XAB2, UVSSA και USP7 (Schwertman et al. 2012).

2.2.2.2 Επιβεβαίωση βλάβης, ξετύλιγμα DNA και εκτομή

Έπειτα από το στάδιο ανίχνευσης της βλάβης, το οποίο διαφέρει μεταξύ των μονοπατιών GG-NER και TC-NER, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα δύο μονοπάτια ακολουθούν μια κοινή «διαδρομή» με τη βοήθεια κοινών πρωτεϊνικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, στρατολογείται ο μεταγραφικός παράγοντας Transcription Factor II H (TFIIH), ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο 10 υπομονάδων με ρόλους τόσο στη μεταγραφή αλλά και στην επιδιόρθωση (Compe and Egly 2012). Από τα μέλη του συμπλόκου TFIIH, οι υπομονάδες του XPB και XPD, με ενεργότητα ATP-εξαρτώμενης ελικάσης, δρουν ώστε να ξετυλιχτεί η

έλικα του DNA γύρω από τη βλάβη, δημιουργώντας τοπικά μια «φουσαλίδα». Ο παράγοντας XPG φαίνεται πως σταθεροποιεί τον TFIIH, ενώ οι παράγοντες XPA και RPA παίζουν ρόλο στην επιβεβαίωση της βλάβης, προστατεύοντας τον κλώνο του DNA στον οποίο δεν υπάρχει βλάβη (Hanawalt and Spivak 2008b). Στη συνέχεια, η ενδονουκλεάση ERCC1-XPF κόβει στο 5' άκρο της «φουσαλίδας» και η XPG στο 3' άκρο αυτής. Μάλιστα έχει βρεθεί πως η τομή στο 5' άκρο προηγείται αυτής στο 3' άκρο (Staresinic et al. 2009).



Εικόνα 3. Μηχανισμός NER. Διάφοροι χημικοί παράγοντες και η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό, οι οποίες αναγνωρίζονται από τα δύο υπομονοπάτια του NER (GGR/GG-NER και TCR/TC-NER). Ο μηχανισμός αναγνώρισης της βλάβης διαφέρει μεταξύ GGR και TCR, ωστόσο έπειτα τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν σε έναν κοινό μηχανισμό, όπου το τμήμα DNA που περιέχει τη βλάβη απομακρύνεται και το επακόλουθο κενό συμπληρώνεται με σύνθεση DNA, έχοντας σαν μήτρα τον άθικτο κλώνο DNA (τροποποίηση από Hanawalt and Spivak 2008).

2.2.2.3 *De novo* σύνθεση DNA και επανένωση

Μετά την αποκοπή του τμήματος του DNA που περιέχει τη βλάβη (25-30 βάσεις), το κενό συμπληρώνεται μέσω *de novo* σύνθεσης DNA, έχοντας ως μήτρα την άθικτη αλληλουχία DNA. Αξίζει να σημειωθεί πως η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κύτταρο, καθορίζει το ποια ένζυμα θα επιτελέσουν τόσο τη σύνθεση όσο και την επανένωση του νεοσυντιθέμενου τμήματος DNA. Έτσι, οι παράγοντες PCNA, RFC1 και οι DNA πολυμεράσες δέλτα και κάπα (DNA pol δ, DNA pol κ) είναι αυτές που επιτελούν το ρόλο της σύνθεσης DNA σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ η DNA πολυμεράση έψιλον (DNA pol ε) συμμετέχει στη διαδικασία μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα (Ogi et al. 2010). Τέλος, το νεοσυντιθέμενο τμήμα DNA επανενώνεται με το υπόλοιπο μέσω της δράσης των XRCC1-DNA λιγάσης (ligase) IIIa και DNA λιγάση I, σε μη διαιρούμενα και διαιρούμενα κύτταρα, αντίστοιχα (Moser et al. 2007).

2.2.3 NER και χρωματίνη

Είναι γεγονός πως όλοι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA, συμπεριλαμβανομένου του NER, λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον της χρωματίνης. Η ιδέα πως η νουκλεοπρωτεϊνική δομή της χρωματίνης θα μπορούσε να έχει ανασταλτικό ρόλο, εμποδίζοντας την πρόσβαση των επιδιορθωτικών μηχανισμών στις βλάβες, οδήγησε στην εγκαθίδρυση του μοντέλου Πρόσβαση/ Επιδιόρθωση/ Επαναφορά (Access/ Repair/ Restore, ARR). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η χρωματίνη στις περιοχές της βλάβης θα πρέπει να τροποποιηθεί ώστε να διευκολυνθεί η πρόσβαση του επιδιορθωτικού μηχανισμού και εφόσον η βλάβη αποκατασταθεί, η χρωματίνη θα πρέπει να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση (Green and Almouzni 2002).

Για το GG-NER μονοπάτι του NER έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη UV-DDB1 αλληλεπιδρά με την ακετυλοτρανσφεράση (Histone Acetyl Transferase, HAT) p300 (Datta et al. 2001; Rapić-Otrin et al. 2002), υποδηλώνοντας έναν ρόλο για το p300 στα αρχικά στάδια της αναγνώρισης της βλάβης. Έχει μάλιστα προταθεί πως η πρωτεΐνη p300 στρατολογείται στις βλάβες που εντοπίζονται σε περιοχές ετεροχρωματίνης μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, συντελώντας στη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης στις περιοχές αυτές (Wang et al. 2013). Ακόμη, έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη DDB1 σχετίζεται με την ακετυλοτρανσφεράση GCN5 (Martinez et al. 2001), η οποία διευκολύνει τη στρατολόγηση των παραγόντων και την NER επαγόμενη επιδιόρθωση, μέσω της ακετυλίωσης της H3K9 (H3K9ac) (Guo et al. 2011). Αντίστοιχα, η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης DDB2 μέσω παρυλίωσης (PolyADP-Ribosylation, PARylation) οδηγεί στη στρατολόγηση του ενζύμου αναδόμησης χρωματίνης, ALC1 (Pines et al. 2012). Τέλος, ο CAF-1 πιστεύεται πως διαδραματίζει ρόλο στην αποκατάσταση της δομής της χρωματίνης μετά την επιδιόρθωση του DNA (Green and Almouzni 2002).

Σχετικά με τον μηχανισμό TC-NER, η πρωτεΐνη CSB κατατάσσεται στις SWI/SNF-like πρωτεΐνες (Troelstra et al. 1992b) ενώ παράλληλα έχει δειχθεί πως διαθέτει ικανότητα ATP-εξαρτώμενης αναδόμησης

χρωματίνης *in vitro* (Citterio et al. 2000). Ακόμη, έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με την ακετυλοτρανσφεράση p300 καθώς και την πρωτεΐνη HMGN1 (Fousteri et al. 2006a) απουσία της οποίας επιφέρει υπερευαισθησία στη UV ακτινοβολία και μειώνει το ρυθμό επιδιόρθωσης των φωτοπροϊόντων σε εμβρυικά κύτταρα ποντικού (Birger et al. 2003). Αντίστοιχα, έχει βρεθεί πως η συνοδός πρωτεΐνη των ιστονών FACT, και συγκεκριμένα η υπομονάδα SPT16, βοηθά στην απομάκρυνση και αντικατάσταση των ιστονών H2A και H2B, στις γονιδιωματικές περιοχές που επιδιορθώνονται από τον μηχανισμό TC-NER (Dinant et al. 2013). Τέλος, η πρωτεΐνη DOT1L (μεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης 79 της ιστόνης H3, H3K79) είναι απαραίτητη για την επανέναρξη της μεταγραφής μετά από γενετοξικό στρες (Oksenysh et al. 2013). Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές πως η ορθή αναδόμηση της χρωματίνης και διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών είναι απαραίτητες τόσο για να αποκτήσει πρόσβαση ο TC-NER στις βλάβες, όσο και για την μετέπειτα αποκατάσταση της μεταγραφής στα ενεργά γονίδια.

2.3 Σύνδρομα που σχετίζονται με έλλειψη λειτουργικού μηχανισμού NER

Η έλλειψη λειτουργικού μηχανισμού του NER οφείλεται σε μεταλλάξεις των κυττάρων της γαμετικής σειράς σε γονίδια που κωδικοποιούν τους διάφορους παράγοντες που συμμετέχουν στο επιδιορθωτικό αυτό μονοπάτι. Τα σύνδρομα που σχετίζονται με έλλειψη λειτουργικού μηχανισμού NER, έχουν αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και μπορούν να οδηγήσουν σε ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων όπως, ήπια ή σοβαρή φωτοευαισθησία, καρκίνος, νευροεκφυλισμός και νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες. Παρότι διακριτά από γενετική σκοπιά, τα επικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων αυτών συχνά προκαλούν προβλήματα και σύγχυση στους επιστήμονες, σχετικά με την σωστή κατάταξη και διάγνωση των περιστατικών. Σημαντικές βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Kraemer et al. 2007; Rapin 2013) παρουσιάζουν λεπτομερώς τη σχέση γονοτύπου/φαινοτύπου για τα σύνδρομα αυτά. Παρακάτω, παρουσιάζονται αναλυτικά τα κυριότερα σύνδρομα που προκαλούνται εξαιτίας της έλλειψης λειτουργικού μηχανισμού NER.

2.3.1 Μελαχρωματική Ξηροδερμία

Η μελαχρωματική ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum, XP) αποτελεί μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από φωτοευαισθησία και αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος (1000 φορές περισσότερο) καθώς επίσης και αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης όγκων που σχετίζονται με τα εσωτερικά όργανα. Ακόμη, στο 30% των ασθενών παρατηρείται νευροεκφυλισμός. Έχουν χαρακτηριστεί επτά ομάδες συμπληρωματικότητας (complementation groups) (XP-A έως G) με ανεπάρκεια σε πρωτεΐνες του μηχανισμού NER (Rapin 2013), ενώ μια όγδοη ομάδα (-V) βρέθηκε πως φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο *POLH*, το οποίο κωδικοποιεί τη μη επιρρεπή σε σφάλμα (error-free) DNA πολυμεράση ήτα (DNA pol η), που σχετίζεται με την αντιγραφή του DNA που περιέχει βλάβες (Masutani et al. 1999).

Οι ασθενείς με μεταλλαγές στα γονίδια *XPC*, *XPE* και *XPV* παρουσιάζουν ήπια έως χαμηλή φωτοευαισθησία, απουσία νευροεκφυλισμού αλλά ταυτόχρονα πολύ μεγάλη προδιάθεση για καρκίνο του δέρματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως, για τις συγκεκριμένες ομάδες συμπληρωματικότητας το TC-NER μονοπάτι είναι λειτουργικό και μόνο το GG-NER (*XP-C*, *XP-E*) ή η μετα-αντιγραφική επιδιόρθωση (*XP-V*) παρουσιάζονται ελαττωματικές. Από την άλλη, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *XPF* και *XPG* είναι αυτοί που δείχνουν ιδιαίτερη «ανθεκτικότητα» στην ανάπτυξη καρκίνου (Fassihi et al. 2016).

2.3.2 Σύνδρομο Cockayne

Το σύνδρομο Cockayne (Cockayne Syndrome, CS) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1936 (Cockayne 1936) από τον Άγγλο γιατρό Edward Alfred Cockayne (1880–1956), ο οποίος βασισμένος στα κλινικά χαρακτηριστικά δύο αδερφών, περιέγραψε γνωρίσματα του συνδρόμου όπως ο νανισμός, η κώφωση και η ατροφία του αμφιβληστροειδούς.

Η συχνότητα εμφάνισης του CS στη δυτική Ευρώπη έχει υπολογιστεί πως είναι 2.7 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο γεννήσεις (Kleijer et al. 2008). Γενετικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση του CS (Tanaka et al. 1981; Lehmann 1982). Το γονίδιο *CSA* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 44 kDa, η οποία διαθέτει πολλαπλές επαναλήψεις 40 αμινοξέων, με το διπεπτιδίο τρυπτοφάνη-ασπαρτικό οξύ να βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξικών επαναλήψεων (WD40 οικογένεια πρωτεϊνών) (Henning et al. 1995). Το γονίδιο *CSB*, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q11, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 1493 αμινοξέων (168 kDa) με ενεργότητα ATPάσης που ανήκει στην οικογένεια των SWI2/SNF2 συμπλόκων αναδόμησης της χρωματίνης (Troelstra et al. 1992a, b). Μάλιστα έχει βρεθεί πως για το CS περίπου το 60% των μεταλλάξεων βρίσκεται στο γονίδιο *CSB* ενώ οι υπόλοιπες στο γονίδιο *CSA*, χωρίς ωστόσο να είναι ξεκάθαρη μια σχέση γονοτύπου/φαινοτύπου (Laugel et al. 2010).

Οι ασθενείς CS ζουν κατά μέσο όρο 12 χρόνια, ενώ στα κλινικά συμπτώματα του συνδρόμου, εκτός από αυτά που προαναφέρθηκαν, περιλαμβάνονται η δερματική φωτοευαισθησία, μικροκεφαλία, καταρράκτης, δυσμυελίνωση και απομυελίνωση των νευρώνων, νευροεκφυλισμός, πρόωρη γήρανση και διανοητική καθυστέρηση (Nance and Berry 1992; Karikkineth et al. 2017). Εξαιτίας του ευρέως φάσματος κλινικών συμπτωμάτων, του χρόνου έναρξης αλλά και της σοβαρότητας αυτών έχει δημιουργηθεί ένας «άτυπος» διαχωρισμός του CS σε τρεις κατηγορίες: 1) CS Τύπου I που θεωρείται το «κλασσικό» CS όπου οι ασθενείς γεννιούνται χωρίς εμφανή χαρακτηριστικά του συνδρόμου αλλά τα εμφανίζουν τα πρώτα χρόνια της ζωής τους, 2) CS Τύπου II όπου τα συμπτώματα εμφανίζονται πολύ νωρίς και ο θάνατος επέρχεται πριν την πρώτη δεκαετία της ζωής και 3) CS Τύπου III όπου τα συμπτώματα αργούν να

εμφανιστούν και οι ασθενείς μπορούν να φθάσουν παραπάνω από τα 40 έτη (Nance and Berry 1992; Rapin 2013).

2.3.3 Συνδυαστικός φαινότυπος Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας / Συνδρόμου Cockayne

Ορισμένες μεταλλάξεις στα γονίδια *XPB*, *XPD* και *XPG* μπορούν να οδηγήσουν σε συνδυαστικούς φαινότυπους που χαρακτηρίζονται ως φαινότυπος Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας / Συνδρόμου Cockayne (XP/CS). Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται από τις δερματικές παθήσεις των XP ασθενών και τις νευρολογικές ανωμαλίες του συνδρόμου CS. Γενικά, οι ασθενείς παρουσιάζουν φωτοευαισθησία και ανώμαλες φακίδες στο δέρμα, ενώ έχουν μικρό ανάστημα, υποανεπτυγμένο αναπαραγωγικό σύστημα και ατροφία στον αμφιβληστροειδή (Kraemer et al. 2007).

2.3.4 Σύνδρομο Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας με νευρολογική ασθένεια

Ασθενείς με μεταλλαγές στα γονίδια *XPA*, *XPB*, *XPD*, *XPF*, *XPF*, *XPG* μπορούν να εμφανίσουν ποικίλης σοβαρότητας προοδευτικό νευροεκφυλισμό σε συνδυασμό με την εμφάνιση καρκίνου (XP with Neurological Disease, XP/ND), ανάλογα με τη μετάλλαξη που εντοπίζεται. Οι παρατηρούμενες νευρολογικές διαταραχές περιλαμβάνουν προοδευτική κώφωση, ανώμαλη βάδιση, ήπια μικροκεφαλία ενώ σε σοβαρές περιπτώσεις παρατηρείται εκτεταμένος νευρωνικός θάνατος σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και του περιφερικού νευρικού συστήματος (Kraemer et al. 2007; Rapin 2013).

2.3.5 Σύνδρομο ευαισθησίας σε υπεριώδη ακτινοβολία

Το σύνδρομο ευαισθησίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV Sensitive Syndrome, UVSS) αποτελεί ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο, το οποίο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1994 (Itoh et al. 1994). Το σύνδρομο αυτό ομοιάζει σε κάποια από τα κλινικά του χαρακτηριστικά με το CS, όπως η φωτοευαισθησία, η τελαγγειεκτασία και οι φακίδες, σε καμία περίπτωση όμως δεν παρουσιάζει τις σοβαρές αναπτυξιακές και νευρολογικές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν το CS. Ενδιαφέρον γεγονός αποτελεί πως με το UVSS έχουν συνδεθεί μεταλλάξεις σε 3 γονίδια: το CSB (Horibata et al. 2004), το CSA (Nardo et al. 2009a) και το UVSSA (UV-Stimulated Scaffold protein A) ένα γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 4p16.3 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 709 αμινοξέων (Nakazawa et al. 2012; Zhang et al. 2012). Η UVSSA πρωτεΐνη έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με την Pol II της επιμήκυνσης της μεταγραφής και άλλα σύμπλοκα του μηχανισμού TC-NER, και πως σταθεροποιεί την πρωτεΐνη CSB μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη USP7 (Nakazawa et al. 2012; Schwertman et al. 2012; Zhang et al. 2012).

2.3.6 Τριχοθειοδυστροφία

Μεταλλάξεις στα γονίδια *XPB*, *XPD*, *TTDN1* και *TTDA* μπορούν να προκαλέσουν την αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy, TTD), η οποία χαρακτηρίζεται από εύθραυστα μαλλιά με έλλειψη θείου, δερματική ιχθύωση, ενώ έχουν αναφερθεί αναπτυξιακά

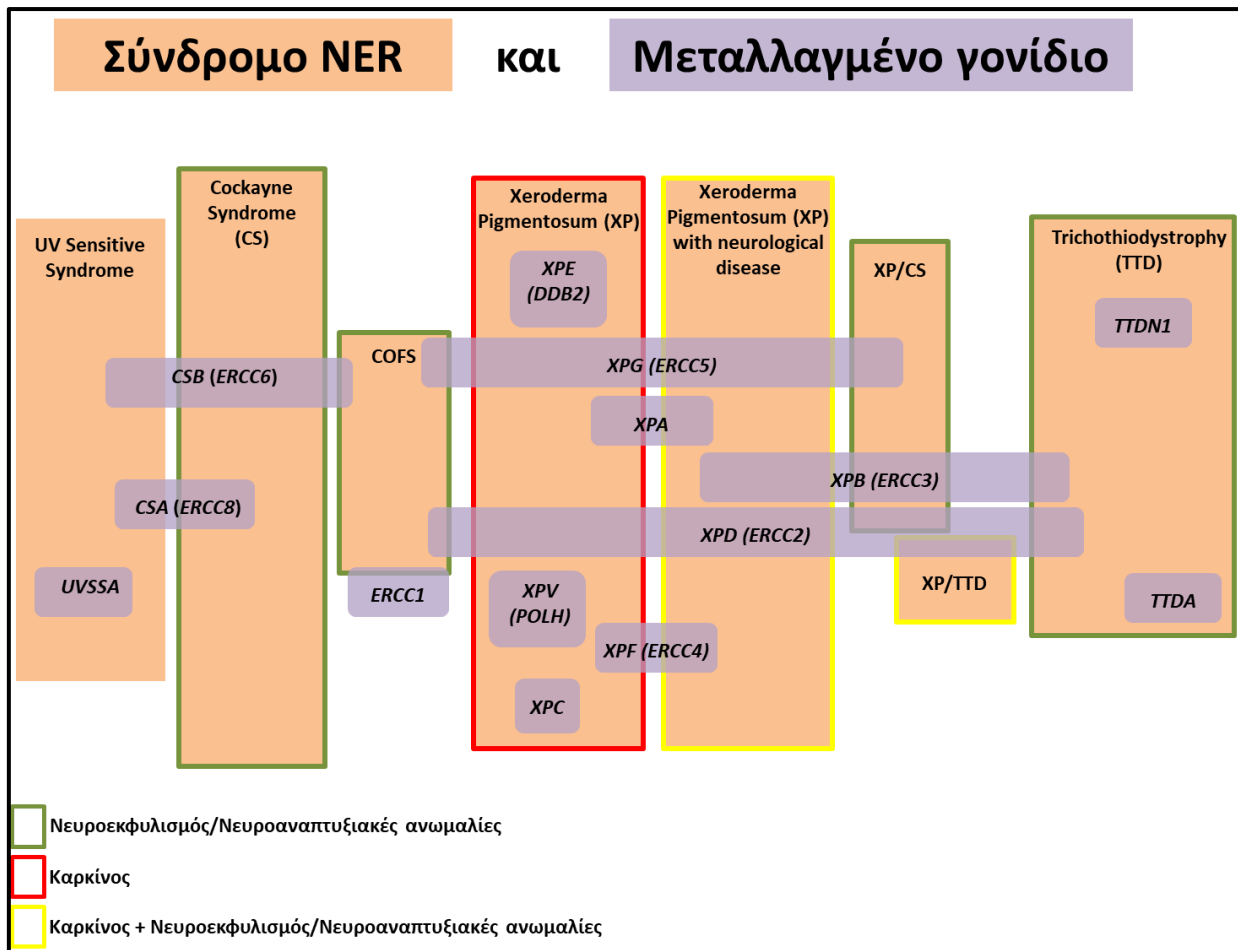
προβλήματα στο νευρικό σύστημα και δυσμυελίνωση (Kraemer et al. 2007). Η απουσία καρκίνου στους TTD ασθενείς δημιουργεί μια μερική επικάλυψη των συμπτωμάτων με αυτά των CS, ωστόσο η κώφωση, η οπτική ατροφία και η καχεξία δεν εμφανίζονται στους TTD ασθενείς (Rapin 2013).

2.3.7 Εγκεφαλο-οπτικο-προσωπο-σκελετικό Σύνδρομο

Το εγκεφαλο-οπτικο-προσωπο-σκελετικό Σύνδρομο (Cerebro-oculo-facio-skeletal Syndrome, COFS) είναι ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από μικροκεφαλία, καταρράκτες ή/και μικροφθαλμία, σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες και διανοητική καθυστέρηση. Το σύνδρομο αυτό θεωρείται πως ανήκει στα σχετιζόμενα με ελαττωματικό μηχανισμό NER σύνδρομα. 14 περιπτώσεις ασθενών έχουν αναφερθεί και οι μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στα γονίδια *CSB*, *XPD*, *XPG* και *ERCC1* αντίστοιχα (Liakos et al. 2017).

2.3.8 Κλινική ετερογένεια και επεξήγηση

Όπως γίνεται κατανοητό από τα παραπάνω (Εικόνα 4), μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια που εμπλέκονται στον μηχανισμό NER μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές ασθένειες. Για παράδειγμα διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *XPD* μπορούν να οδηγήσουν σε 6 διαφορετικές ασθένειες σχετιζόμενες με τον μηχανισμό NER (*XP*, *XP/CS*, *CP/TTD*, *COFS*, *TTD*, *XP/ND*). Αντίστροφα, μια ασθένεια μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια που εμπλέκονται στον μηχανισμό NER.



Εικόνα 4. Σχέση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου στα σύνδρομα που σχετίζονται με τον επιδιορθωτικό μηχανισμό NER (τροποποίηση από (Liakos et al. 2017)

Φαίνεται λοιπόν πως, τόσο η ακριβής θέση της μεταλλαγής όσο και η ποσότητα αλλά και σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης, θα μπορούσαν να εξηγήσουν την παρατηρούμενη πολυπλοκότητα. Για παράδειγμα, μια παρανοηματική μετάλλαξη (missense mutation), η οποία όμως μπορεί να είναι «ανεκτή» σε επίπεδο λειτουργίας της πρωτεΐνης, σίγουρα θα αντιστοιχεί σε ηπιότερο φαινότυπο σε σχέση με μια μη νοηματική μετάλλαξη (nonsense mutation), η οποία οδηγεί σε ελλιπή ή μη λειτουργική πρωτεΐνη. Επίσης, δεδομένου ότι ο μηχανισμός NER δρα ως μοριακός «καταρράκτης» όπου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που συμμετέχουν είναι κρίσιμες για την ορθή λειτουργία του, μεταλλάξεις οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάζουν κρίσιμα τμήματα των πρωτεϊνών για τις αλληλεπιδράσεις αυτές, θα οδηγούν σε πιο σοβαρές, αναλογικά, διαταραχές. Ωστόσο, το γεγονός πως η ίδια μετάλλαξη βρέθηκε να οδηγεί σε δύο διακριτούς, NER σχετιζόμενους, φαινοτύπους (Oh et al. 2006), υποδηλώνει πως το γενετικό υπόβαθρο ή/και άλλοι (όχι ακόμα χαρακτηρισμένοι) παράγοντες θα μπορούσαν να καθορίσουν τις σχέσεις γονότυπου/φαινότυπου στα σύνδρομα που σχετίζονται με ελαττωματικό μηχανισμό NER.

2.4 Μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης II

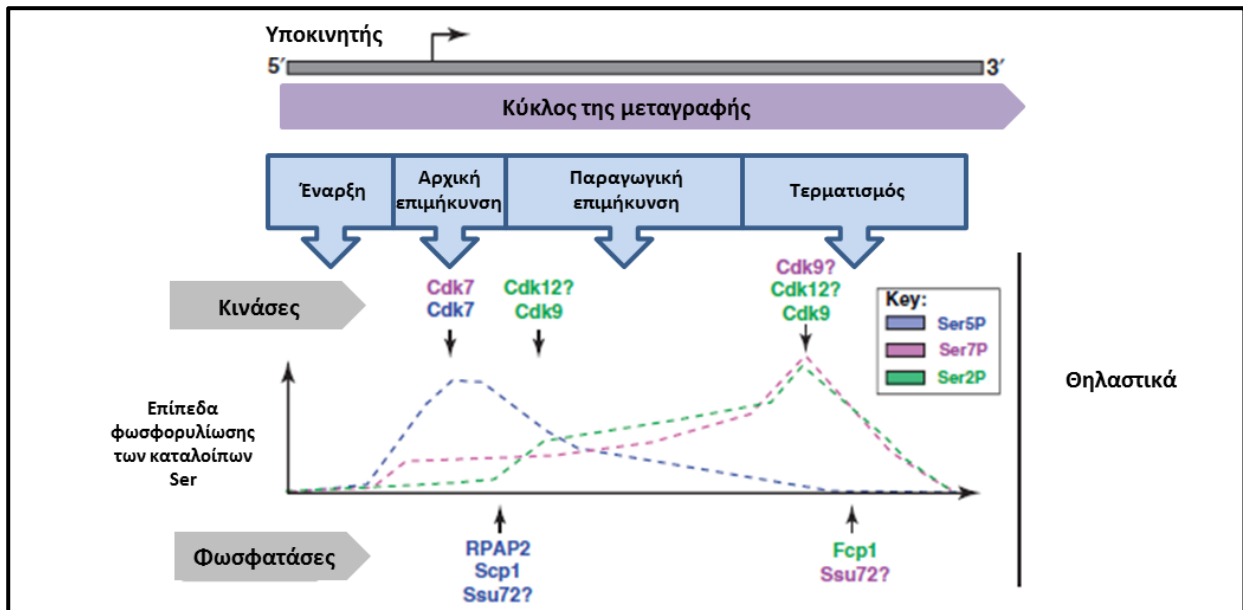
Η μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης II (Pol II ή RNAPII) αποτελεί θεμελιώδη και υψηλά ελεγχόμενη κυτταρική διαδικασία μέσω της οποίας η κωδικοποιημένη γενετική πληροφορία του DNA μεταφέρεται στο αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η σύνθεση όλων των mRNA, των μακρών μη κωδικών RNA, αλλά και κάποιων μικρών πυρηνικών (small nuclear RNA, snRNA) και μικρών RNA πυρηνίσκων (small nucleolar RNA, snoRNA), επιτελείται από την Pol II. Η Pol II είναι ένα ολόενζυμο το οποίο αποτελείται από 12 διαφορετικές υπομονάδες (Hahn 2004). Στα θηλαστικά, το καρβοξυτελικό άκρο (Carboxy-Terminal Domain, CTD) της μεγαλύτερης υπομονάδας της Pol II ονομάζεται Rpb1 και διαθέτει 52 επαναλήψεις του επταπεπτιδίου Τυροσίνη¹-Σερίνη²-Προλίνη³-Θρεονίνη⁴-Σερίνη⁵-Προλίνη⁶-Σερίνη⁷ (Tyr¹-Ser²-Pro³-Thr⁴-Ser⁵-Pro⁶-Ser⁷) (Egloff et al. 2012). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των αμινοξικών καταλοίπων του επταπεπτιδίου είναι πως αυτά μπορούν να τροποποιηθούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Το γεγονός αυτό, δημιουργεί μια μεγάλη ποικιλία συνδυασμών, καθένας από τους οποίους μπορεί να χαρακτηρίζει και να αφορά διαφορετικά στάδια του μεταγραφικού κύκλου (βλέπε Κεφάλαιο 2.4.1). Η επικρατούσα υπόθεση είναι πως το CTD αποτελεί μια πλατφόρμα σηματοδότησης και διαρκών αλληλεπιδράσεων, μεταξύ του μηχανισμού της μεταγραφής και παραγόντων που συντελούν στη συρραφή, την τροποποίηση του mRNA (Bentley 2014) αλλά και παράγοντες που τροποποιούν το ίδιο το CTD, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ίδια τη διαδικασία της μεταγραφής (Egloff et al. 2012).

2.4.1 Ο κύκλος της μεταγραφής και ο CTD κώδικας

Όπως προαναφέρθηκε, τα αμινοξικά κατάλοιπα του επαναλαμβανόμενου επταπεπτιδίου του CTD αποτελούν υποστρώματα για ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, η τυροσίνη, η θρεονίνη και οι τρεις σερίνες (Ser) (5 από τα 7 κατάλοιπα) μπορούν να τροποποιηθούν μέσω φωσφορυλίωσης. Ακόμη οι δύο προλίνες μπορούν να ισομερισθούν μεταξύ *cis*- και *trans*- διαμόρφωσης (Heidemann et al. 2013). Άλλες τροποποιήσεις που έχουν αναφερθεί για κατάλοιπα του CTD αποτελούν η γλυκοζυλίωση και η μεθυλίωση (Kelly et al. 1993; Sims et al. 2011).

Η κατάσταση φωσφορυλίωσης της Pol II ελέγχεται από μια σειρά κινασών και φωσφατασών, οι οποίες δρουν στα διάφορα στάδια της πορείας της μεταγραφής και ρυθμίζουν την εξέλιξή της. Στην αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφή, καθοριστικό ρόλο έπαιξαν τα διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα που αναπτύχθηκαν έναντι διαφορετικών ισομορφών της Pol II (Heidemann et al. 2013), αλλά και διάφορες επιστημονικές μελέτες που βασίστηκαν στην τεχνική ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) (Kim et al. 2010; Mayer et al. 2010; Bataille et al. 2012). Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στη διατύπωση του μοντέλου του «CTD κώδικα» και του μεταγραφικού κύκλου (Komarnitsky et al. 2000). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η Pol II με υποφωσφορυλιωμένο το CTD (Pol II-hypo) προσδένεται στον υποκινητή και μαζί με τους μεταγραφικούς παράγοντες συντελεί το προεναρκτήριο σύμπλοκο της μεταγραφής (Pre Initiation Complex, PIC). Στη

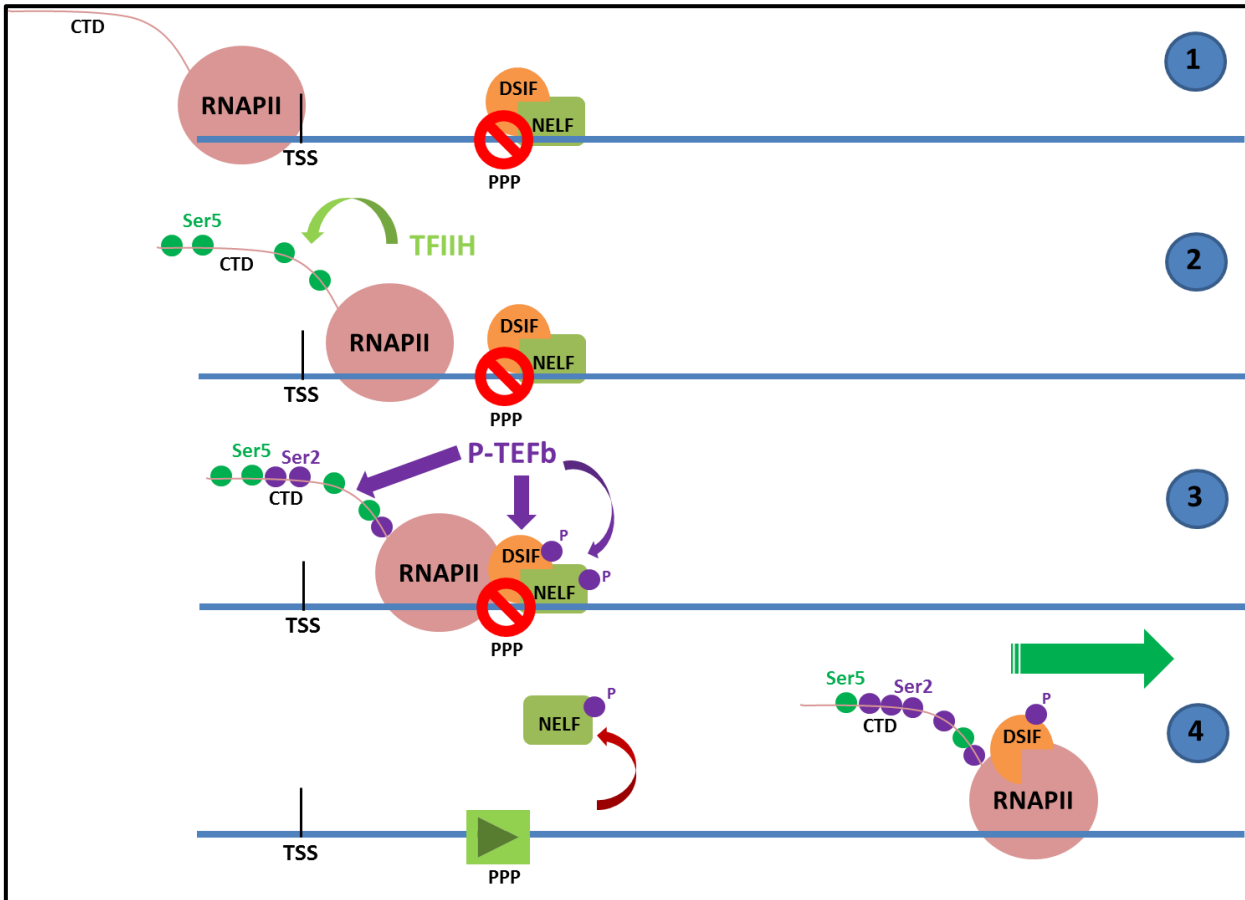
συνέχεια της μεταγραφικής πορείας, σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Pol II με διάφορα μόρια κινασών και φωσφατασών, καθορίζουν το πρότυπο φωσφορυλίωσης του CTD (βλέπε εικόνα 5).



Εικόνα 5. Επίπεδα φωσφορυλίωσης των καταλοίπων σερίνης (Ser) της CTD στα διάφορα στάδια του κύκλου της μεταγραφής, καθώς και τα ένζυμα κινασών και φωσφατασών που τα ρυθμίζουν (τροποποίηση από Egloff et al. 2012)

Πιο συγκεκριμένα, η έναρξη της μεταγραφής συνοδεύεται από φωσφορυλίωση του CTD στη Ser5 (Pol II-ser5P) η οποία επιτελείται από την υπομονάδα Cdk7 του παράγοντα TFIIF. Η ίδια κινάση έχει βρεθεί πως φωσφορυλιώνει και το αμινοξικό κατάλοιπο Ser7 του CTD στο 5' άκρο των γονιδίων (Egloff et al. 2012; Heidemann et al. 2013). Καθώς η πολυμεράση προωθείται από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής, στο στάδιο της παραγωγικής επιμήκυνσης, αυξάνεται η φωσφορυλίωση του CTD στο κατάλοιπο της Ser2 (Pol II-ser2P). Η μετάβαση αυτή, θεωρείται ένα κομβικό σημείο ελέγχου της μεταγραφής και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε συνθήκες κυτταρικού στρες (Mahat et al. 2016; Nilson et al. 2017). Ειδικότερα, η Pol II μετά την έναρξη της μεταγραφής (και την φωσφορυλίωση της Ser5) σταματάει περίπου 60 βάσεις καθοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site, TSS) στις θέσεις παύσης της μεταγραφής πλησίον του υποκινητή (Promoter Proximal Pause, PPP). Στις θέσεις αυτές βρίσκονται και οι παράγοντες NELF (Negative Elongation Factor) και DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor), οι οποίοι αναστέλλουν την περαιτέρω προώθηση των μορίων Pol II στη φάση της παραγωγικής επιμήκυνσης. Για την απελευθέρωση των μορίων της Pol II από τις θέσεις PPP, απαιτείται η δράση του ενζύμου P-TEFb, και συγκεκριμένα της υπομονάδας του Cdk9, η οποία δρά στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές φωσφορυλιώνοντας τους παράγοντες NELF και DSIF, προκαλώντας την απομάκρυνση του παράγοντα NELF από τη χρωματίνη και την μετατροπή του DSIF σε παράγοντα που ευνοεί τη μεταγραφική επιμήκυνση. Ταυτόχρονα όμως, το P-TEFb δρά στο CTD άκρο της Pol II φωσφορυλιώνοντας την σερίνη

της θέσης 2 (Pol II-ser2P), ευνοώντας τη μετάβαση του μορίου της Pol II από το στάδιο της έναρξης σε αυτό της παραγωγικής επιμήκυνσης (Wada et al. 1998; Gilchrist et al. 2008) (βλέπε Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Έναρξη της μεταγραφής και ρύθμιση της απελευθέρωσης των μορίων της Pol II (RNAPII) από τις θέσεις PPP. Στην εικόνα απεικονίζονται τα στάδια (1) Συγκρότησης του προεναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής (PIC), (2) Έναρξης της μεταγραφής και φωσφορυλίωσης της CTD της RNAPII στην Ser5, (3) Παύσης της μεταγραφής στις θέσεις PPP και στρατολόγησης της κινάσης P-TEFb, (4) Απελευθέρωσης της RNAPII από τις θέσεις PPP και προώθηση της μεταγραφής στη φάση της παραγωγικής επιμήκυνσης. Στο σχήμα διακρίνονται τα ένζυμα που συμμετέχουν στα διάφορα στάδια καθώς και η κατάσταση φωσφορυλίωσης των διάφορων παραγόντων, στα στάδια αυτά.

Η αύξηση της Pol II-ser2P, κατά την παραγωγική επιμήκυνση, συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων της Pol II ser5P. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των φωσφατασών RPA2, SCP1 και Ssu72 οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στο 5' άκρο των γονιδίων. Αντίθετα, τα επίπεδα της Pol II-ser7P παραμένουν σταθερά μέχρι τις θέσεις πολυαδενυλίωσης (poly-A) στο 3' άκρο των γονιδίων. Μάλιστα, η φωσφορυλίωση της Ser7 έχει βρεθεί πως διατηρείται λόγω της δράσης της κινάσης Bur1, η οποία διευκολύνει τη μεταγραφική επιμήκυνση (Tietjen et al. 2010). Αντίστοιχα, όταν η μεταγραφή φθάσει στο τέλος της, η φωσφατάση FCP1 αποφωσφορυλιώνει τα Ser2 κατάλοιπα, ενώ η Ser7 απομακρύνεται από την φωσφατάση Ssu72. Κατά συνέπεια, η Pol II ως μη φωσφορυλιωμένο μόριο πλέον, μπορεί να συμμετάσχει σε έναν επιπλέον κύκλο της μεταγραφής (Egloff et al. 2012; Heidemann et al. 2013).

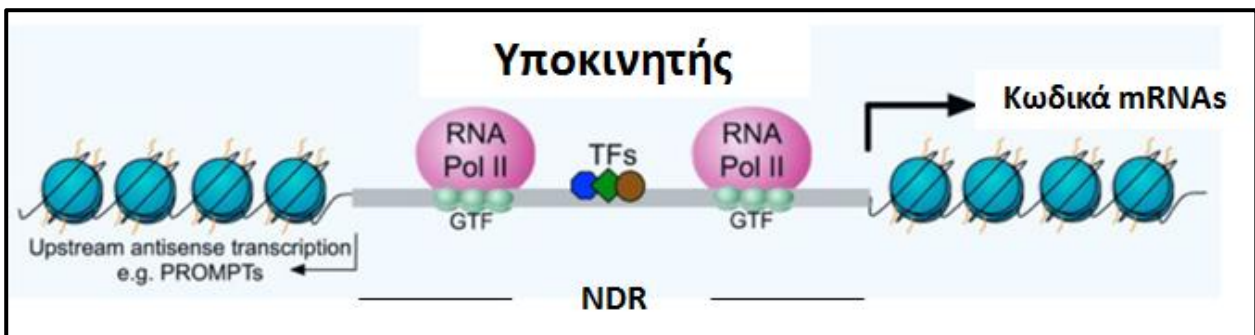
2.4.2 Μη κωδική μεταγραφή

Τις περασμένες δεκαετίες οι έρευνες σχετικά με τη μεταγραφή είχαν εστιάσει στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, λόγω της αφθονίας και της ευκολίας με την οποία τα γονίδια αυτά αλλά και τα μετάγρατά τους, μπορούσαν να απομονωθούν και μελετηθούν. Ωστόσο, η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών με μεγαλύτερη ευαισθησία και διακριτική ικανότητα αποκάλυψε πως μόνο το 2% του γονιδιώματος αντιστοιχεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (ENCODE et al. 2012), ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε πως περίπου το 62-75% του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται (Djebali et al. 2012).

Έτσι, εκτός από τα συμβατικά μη κωδικά μετάγραφα όπως μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA), ριβοσωμικό RNA (rRNA), μικρό πυρηνικό RNA (snRNA), μικρό RNA πυρηνίσκου (snoRNA), το ενδιαφέρον εστιάστηκε και σε άλλα ήδη μη κωδικά μετάγραφα μεταξύ των οποίων είναι τα μετάγραφα ανοδικά του υποκινητή (PROMoter uPstream Transcripts, PROMPTs) και τα μετάγραφα των ενισχυτών (enhancer RNAs, eRNAs), τα οποία θα αναλυθούν περαιτέρω στη συνέχεια.

2.4.2.1 Μετάγραφα ανοδικά του υποκινητή

Σημαντικό ποσοστό της μη κωδικής μεταγραφής που αναφέρεται παραπάνω, μπορεί να αποδοθεί στην αμφίδρομη (bidirectional) μεταγραφή που λαμβάνει χώρα στους υποκινητές των γονιδίων (Meng and Bartholomew 2018), η οποία θεωρείται πλέον γενικό χαρακτηριστικό τους (Andersson et al. 2015). Η δομή και τα χαρακτηριστικά τέτοιων υποκινητών περιγράφεται επιγραμματικά στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Χαρακτηριστικά και δομή αμφίδρομα μεταγραφόμενων υποκινητών. Ο υποκινητής εδράζεται σε μια περιοχή ελεύθερη από νουκλεοσώματα (Nucleosome Depleted Region, NDR), στην οποία μπορούν να στρατολογηθούν δύο ανεξάρτητα PICs (αποτελούμενα από RNAPII και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (General Transcription Factors, GTFs)), τα οποία ξεκινούν τη μεταγραφή προς αντίθετες κατευθύνσεις. Ένας τέτοιος υποκινητής μπορεί να υποστηρίζει την μεταγραφή σταθερών (από άποψη ανθεκτικότητας στην αποικοδόμηση) μεταγράφων και προς τις δύο κατευθύνσεις, είτε σταθερών – μη σταθερών (π.χ. ζεύξη mRNA-PROMPTs, βλέπε παρακάτω), είτε μη σταθερών – μη σταθερών (βλέπε παρακάτω) μεταγραφή στους ενισχυτές (Core et al. 2014). Η εικόνα είναι τροποποιημένη από (Meng and Bartholomew 2018).

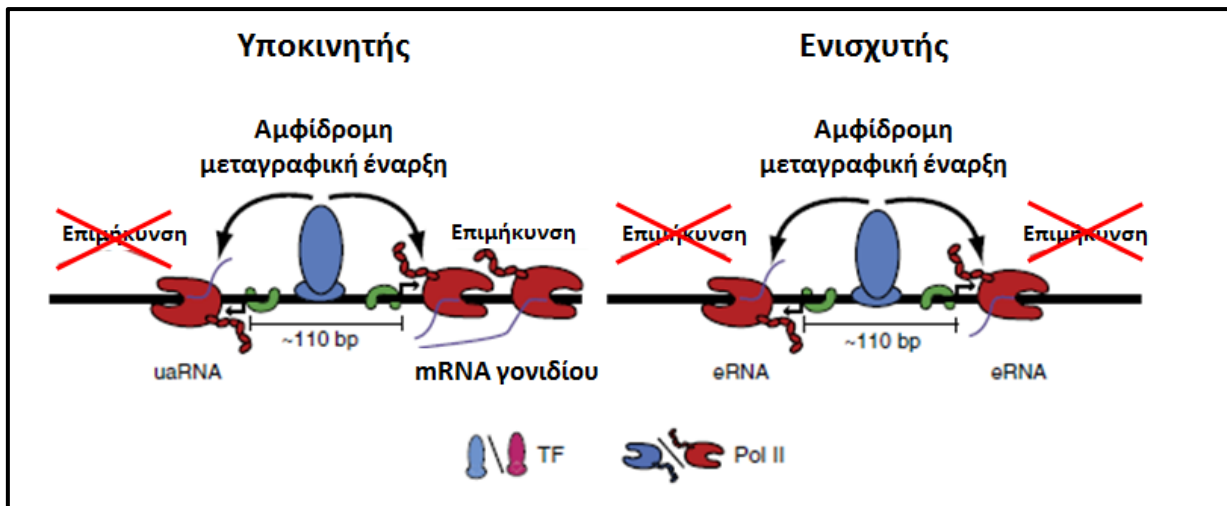
Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η πλειονότητα των ενεργών TSSs γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνη, εμφανίζουν μεταγραφική δραστηριότητα η οποία ξεκινά ανοδικά του TSS του γονιδίου και βρίσκεται σε αντίθετη κατεύθυνση (antisense) με αυτήν του γονιδίου (Core et al. 2008)(Andersson et al. 2014b).

Τέτοια μετάγραφα θεωρούνται και τα μετάγραφα ανοδικά του υποκινητή (Promoter Upstream Transcripts, PROMPTs) (Preker et al. 2008), τα οποία εντοπίζονται ανοδικά των ενεργών TSSs, είναι μη κωδικά, μπορούν να έχουν ίδια (sense) ή αντίθετη κατεύθυνση (antisense) σε σχέση με αυτήν του γονιδίου, έχουν ουρά poly-A και είναι ευαίσθητα σε αποικοδόμηση από το εξώσωμα (exosome). Σχετικά με την μη σταθερότητα και αποικοδόμηση των PROMPTs, έχει προταθεί πως μπορούν να οφείλονται σε μοτίβα αλληλουχιών που προάγουν την πολυαδενυλίωση και τα οποία απαντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα ανοδικά, παρά καθοδικά των υποκινητών (Ntini et al. 2013). Αντίστροφα, έχει βρεθεί μεγαλύτερη συχνότητα μοτίβων αλληλουχιών που προωθούν τη συρραφή καθοδικά των υποκινητών σταθερών μεταγράφων, σε σχέση με υποκινητές ευαίσθητων σε αποικοδόμηση μεταγράφων (Core et al. 2014). Τέτοιες διαφοροποιήσεις, πιστεύεται μεταξύ άλλων πως, οδηγούν στην αποικοδόμηση των PROMPTs μέσω του εξωσώματος και υποδεικνύουν μια σχέση μεταξύ γονιδιωματικής αλληλουχίας και σταθερότητας του παραγόμενου μεταγράφου.

2.4.2.2 Η μεταγραφή στους ενισχυτές και τα eRNAs

Ως μονάδες μεταγραφής οι ενισχυτές παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με αυτές των υποκινητών των γονιδίων (βλέπε παραπάνω και Εικόνα 8). Για παράδειγμα, στους ενισχυτές (όπως και στους υποκινητές) φαίνεται πως η μεταγραφή πηγάζει από μια NDR περιοχή, η οποία περιβάλλεται από νουκλεοσώματα, στα άκρα της οποίας συγκροτούνται ανεξάρτητα PICs που μπορούν να πυροδοτήσουν αμφίδρομα την μεταγραφή (sense και antisense). Μάλιστα, στις περιοχές των ενισχυτών, έχει επιβεβαιωθεί η πρόσδεση GTFs και Pol II (de Santa et al. 2010; Koch et al. 2011; Core et al. 2014). Ακόμη, πρόσφατα ευρήματα έδειξαν πως στους ενισχυτές (όπως και στους υποκινητές) υπάρχει παύση της μεταγραφής σε απόσταση περίπου 70 βάσεων από το TSS του ενισχυτή (enhancer TSS, eTSS), η οποία ελέγχεται από τη δράση της κινάσης P-TEFb (Henriques et al. 2018).

Η μεταγραφή αποτελεί ένα από τα γνωρίσματα των ενεργών ενισχυτών (Andersson et al. 2014a), μαζί με ισχυρότερα επίπεδα επιγενετικών τροποποιήσεων ιστονών που συσχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση (π.χ. H3K27ac), πρόσδεση μεταγραφικών ενεργοποιητών και περισσότερο προσβάσιμη χρωματίνη (Li et al. 2016). Σε αντίθεση με τους υποκινητές των γονιδίων, όπου η μεταγραφή του κωδικού mRNA υπερτερεί αυτής του PROMPT, στους ενεργούς ενισχυτές παρόμοια επίπεδα μεταγραφής εντοπίζονται εκατέρωθεν του eTSS (Andersson et al. 2014a). Τα eRNAs είναι μη κωδικά, κατά κανόνα μικρά σε μήκος και δεν είναι προϊόντα συρραφής (Andersson et al. 2014a). Επίσης, όπως και τα PROMPTs, τα eRNAs είναι ευαίσθητα σε αποικοδόμηση από το εξώσωμα (Andersson et al. 2014a; Core et al. 2014; Henriques et al. 2018).



Εικόνα 8. Σύγκριση δομής και μεταγραφικής δραστηριότητας υποκινητών/ενισχυτών. Τόσο στους υποκινητές, όσο και στους ενισχυτές η μεταγραφή ξεκινά από δύο TSS, τα οποία απέχουν περίπου 110 bp. Η μεταγραφή πυροδοτείται από δύο ανεξάρτητα PICs, που μεταγράφουν προς αντίθετες κατευθύνσεις. Στην περίπτωση του υποκινητή το mRNA του γονιδίου είναι σταθερό και μεταγράφεται σε μεγαλύτερη ποσότητα, ενώ το PROMPT/uaRNA είναι ευαίσθητο σε τερματισμό/αποικοδόμηση. Στην περίπτωση του ενισχυτή και τα δύο μη κωδικά μετάγραφα που συντίθενται είναι μικρά και ευαίσθητα σε τερματισμό/αποικοδόμηση. Τροποποίηση από Core et al. 2014.

Η μη κωδική φύση των eRNAs έχει δημιουργήσει ερωτήματα σχετικά με τη λειτουργία των μεταγράφων αυτών. Ουσιαστικά, η συζήτηση επικεντρώνεται γύρω από τρεις υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση αναφέρει πως τα eRNAs αποτελούν «μεταγραφικό θόρυβο» της στοχαστικής πρόσδεσης της Pol II στο ευνοϊκό περιβάλλον της χρωματίνης του ενισχυτή (προσβασιμότητα, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών), δημιουργώντας ταυτόχρονα ένα «απόθεμα» μεταγραφικών συμπλόκων για τους υποκινητές. Η δεύτερη άποψη αναφέρει πως η μεταγραφή των ενισχυτών μπορεί να επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων. Αυτό μπορεί να γίνεται είτε δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον στη χρωματίνη για την ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε μακρινές αποστάσεις, είτε –στην περίπτωση κάποιων ενδογονιδιακών (intragenic) ενισχυτών- εξασθενώντας την έκφραση των γονιδίων μέσα στα οποία βρίσκονται, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο, σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες (Cinghu et al. 2017). Η τελευταία υπόθεση αναφέρει πως τα eRNAs αυτά καθ' εαυτά έχουν λειτουργικό ρόλο, αφού μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μεταγραφικούς παράγοντες ή παράγοντες που ευνοούν το αναδίπλωμα της χρωματίνης μεταξύ υποκινητή και ενισχυτή (Chromosomal Looping Factors, CLFs), προάγουν τη γονιδιακή έκφραση. Εναλλακτικά, τα eRNAs μπορούν να προσδένονται με μεταγραφικούς καταστολείς, αναστέλλοντας τη λειτουργία τους. Οι μη αμοιβαίως αποκλειόμενες αυτές υποθέσεις παραθέτονται αναλυτικά, μαζί με σχετικές μελέτες που τις υποστηρίζουν, στο άρθρο ανασκόπησης των Li et al. 2016 .

2.5 Χρωματίνη και Μεταγραφή

Ο όρος χρωματίνη αναφέρεται στο νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες νουκλεοσωμάτων. Τα νουκλεοσώματα με τη σειρά τους αποτελούνται

από DNA μήκους 147 ζευγών βάσεων (147 base pairs, 147bp), το οποίο περιελίσσεται 1.7 φορές γύρω από το οκταμερές των ιστονών (το οποίο περιέχει 2 υπομονάδες από καθεμία εκ των H2A, H2B, H3, H4)(Luger et al. 1997). Μέσω των νουκλεοσωμάτων επιτυγχάνεται η «σύμπτυξη» του γενετικού υλικού έως 20.000 φορές περισσότερο, ώστε το DNA να χωρέσει στον μικρό όγκο του πυρήνα. Δεδομένου όμως πως κυτταρικές διαδικασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η επιδιόρθωση του DNA, λαμβάνουν χώρα σε χρωματινικό περιβάλλον, είναι εύλογο πως η δομή της χρωματίνης θα πρέπει να είναι δυναμική, ώστε να επιτρέπει στους αντίστοιχους πρωτεϊνικούς παράγοντες να αποκτούν «πρόσβαση» στο DNA. Έτσι λοιπόν, πρωτεΐνες όπως τα ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης τα οποία μπορούν να προκαλούν μετακίνηση ή/και έξωση νουκλεοσωμάτων αλλά και ένζυμα που τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τις ιστόνες, μπορούν να αλλάζουν τις ιδιότητες και την κατανομή των νουκλεοσωμάτων (Zentner and Henikoff 2013).

Οι ιστόνες μπορούν να τροποποιηθούν μετα-μεταφραστικά, και τουλάχιστον 8 διαφορετικά είδη τροποποιήσεων έχουν εντοπιστεί σε συγκεκριμένα αμινοξέα, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

Είδος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης	Αμινοξικό κατάλοιπο που τροποποιείται
Ακετυλίωση	K-ac
Μεθυλίωση (Λυσίνης)	K-me1, K-me2, K-me3
Μεθυλίωση (Αργινίνης)	R-me1, R-me2a, R-me2s
Φωσφορυλίωση	S-ph, T-ph
Ουβικιτίνωση	K-ub
SUMOλίωση	K-su
ADP-ριβοζυλίωση	E-ar
Από-ιμίνωση	Αργινίνη>Κιτρουλίνη
Ισομερισμός (Προλίνης)	P-cis> P-trans

Πίνακας 1. Είδη τροποποιήσεων που έχουν εντοπισθεί στις ιστόνες και αμινοξικά κατάλοιπα που τροποποιούνται. K: Λυσίνη, R: Αργινίνη, S: Σερίνη, T: Θρεονίνη, E: Γλουταμικό οξύ, P: Προλίνη, (τροποποίηση από (Kouzarides 2007).

Οι τροποποιήσεις των ιστονών πραγματοποιούνται από ειδικά ένζυμα, τα οποία μπορεί να παρουσιάζουν είτε υψηλή, είτε πιο ευρεία ειδικότητα. Από την άλλη, οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν τόσο να «διαγράφονται» από ένζυμα όπως αποακετυλάσες, απομεθυλάσες, φωσφατάσες, όσο και να ανιχνεύονται από συγκεκριμένες περιοχές (bromodomains, chromodomains) διαφόρων πρωτεϊνών (Marmorstein and Zhou 2014), δημιουργώντας ένα δίκτυο μακρομοριακών αλληλεπιδράσεων το οποίο καθορίζει και ρυθμίζει την ενεργότητα της χρωματίνης. Στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν αποδοθεί ιδιαίτεροι ρόλοι σε διαδικασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, η επιδιόρθωση και το «πακετάρισμα» του DNA. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις φαίνεται να δρουν με δύο κυρίως

τρόπους. Πρώτον, επηρεάζοντας τη σύνδεση μεταξύ νουκλεοσωμάτων και DNA, προκαλώντας είτε τοπικό «ξετύλιγμα» της δομής, είτε περαιτέρω συμπύκνωση, και δεύτερον, προκαλώντας τη στρατολόγηση πρωτεϊνών οι οποίες τροποποιούν περαιτέρω τη χρωματίνη, μέσω των ενζυματικών τους δράσεων (π.χ ΑΤΡάσες αναδόμησης χρωματίνης). Ακόμη, με βάση το πρότυπο που εμφανίζουν, διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν συσχετισθεί τόσο με διάφορα στάδια της ανάπτυξης και του κυτταρικού κύκλου, όσο και με ρυθμιστικές γονιδιωματικές περιοχές όπως οι ενισχυτές και οι υποκινητές (Smolle and Workman 2013).

2.5.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών και μεταγραφή

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει μεγάλη πρόοδος σχετικά με τον χαρακτηρισμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ιστονών που σχετίζονται με τη μεταγραφή. Γενικά, οι τροποποιήσεις ιστονών μπορούν να διαχωριστούν σε εκείνες που έχουν συσχετισθεί με την ενεργώς μεταγραφόμενη χρωματίνη (ευχρωματίνη) και σε εκείνες που συσχετίστηκαν με την συμπυκνωμένη, μη ενεργή μεταγραφικά χρωματίνη (ετεροχρωματίνη). Με την εξαίρεση της ακετυλίωσης που συνδέεται αποκλειστικά με την ενεργό μεταγραφή (βλέπε παρακάτω), οι υπόλοιπες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών (μεθυλίωση, ουβικιτίνωση, φωσφορυλίωση, σουμολίωση) έχουν συσχετισθεί τόσο με ενεργοποίηση όσο και με καταστολή της μεταγραφής, εξαρτώμενου τόσο του τροποποιημένου ιστονικού καταλοίπου, όσο και της σχετικής θέσης της τροποποίησης αυτής στο γονιδίωμα (π.χ. υποκινητής ή κωδική περιοχή).

Καθώς στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, οι μελέτες εστίασαν κυρίως σε 2 μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με την μεταγραφική ενεργοποίηση (H3K27ac) και την μεταγραφική σίγαση (H3K27me3), στη συνέχεια θα γίνει στις συγκεκριμένες τροποποιήσεις και στα ένζυμα που ρυθμίζουν τα επίπεδά τους, αφού πρώτα περιγραφούν κάποιες γενικές έννοιες της ακετυλίωσης και μεθυλίωσης ιστονών, αντίστοιχα.

Ακετυλίωση: Η ακετυλίωση των ιστονών υπήρξε η πρώτη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που χαρακτηρίστηκε και συνδέθηκε άμεσα με την ενεργό μεταγραφή (Allfrey et al. 1964; Pogo et al. 1966). Η ακετυλίωση ουδετεροποιεί το θετικό φορτίο των ιστονών, διαταράσσοντας με αυτόν τον τρόπο τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιστονών και DNA, αυξάνοντας την προσβασιμότητα των συμπλόκων της μεταγραφής στο γενετικό υλικό. Η ακετυλίωση των ιστονών πραγματοποιείται από ένζυμα τα οποία αναφέρονται ως ακετυλοστρανσφεράσες ιστονών (Histone Acetyltransferases, HATs). Με βάση την ομολογία των αλληλουχιών τους, οι ακετυλοστρανσφεράσες μπορούν να χωριστούν σε 5 υποοικογένειες. Στον πίνακα 2 παραθέτονται οι υποοικογένειες των HATs μαζί με κάποιες από τις κυριότερες πρωτεΐνες της κάθε κατηγορίας. Αντίστοιχα, η ακετυλίωση σε κατάλοιπα ιστονών μπορεί να

αντιστρέφεται, καθώς ειδικά ένζυμα, οι αποακετυλάσες ιστονών (Histone Deacetylases, HDACs), μπορούν να υδρολύουν τους δεσμούς μεταξύ ιστονών και ακετυλο-ομάδας (Lombardi et al. 2011).

Υπο-οικογένειες των HAT	Κυριότερα πρωτεϊνικά μέλη της οικογένειας
HAT1	γHat1
Gcn5/PCAF	γGcn5, hGCN5, hPCAF
MYST	γEsa1, γSas2, γSas3, hMOZ, dMof, hMOF, hTIP60, hHBO1
p300/CBP	hp300, hCBP
Rtt109	γR11109

Πίνακας 2. Υπο-οικογένειες των ακετυλοτρανσφερασών. γ: πρωτεΐνη σε ζύμη, h: ανθρώπινη πρωτεΐνη (τροποποίηση από Marmorstein and Zhou 2014).

Μεθυλίωση: Οι μεθυλοτρανσφεράσες, σε αντίθεση με τις ακετυλοτρανσφεράσες, παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή ειδικότητα, τροποποιώντας ένα κατάλοιπο λυσίνης σε μία ιστόνη. Η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να έχει ως συνέπεια τόσο μεταγραφική ενεργοποίηση, όσο και μεταγραφική καταστολή. Μεθυλίωσεις στα αμινοξικά κατάλοιπα των ιστονών H3K4, H3K36, H3K79, έχουν συσχετισθεί με την ενεργό μεταγραφή. Σε κύτταρα ζύμης έχει βρεθεί πως η H3K4me3 εντοπίζεται στο 5' άκρο των γονιδίων και σχετίζεται με την Pol II-ser5P. Από την άλλη, η H3K36me3 συσσωρεύεται στο 3' άκρο των γονιδίων και βρίσκεται να σχετίζεται με την Pol II-ser2P. Ένας ακόμα ρόλος που έχει αποδοθεί στην H3K36me3 είναι πως καταστέλλει την έναρξη της μεταγραφής από τις λεγόμενες κρυπτικές θέσεις (cryptic start sites) που βρίσκονται στο εσωτερικό των γονιδίων (Li et al. 2007). Τέλος, η H3K79me2 τροποποιείται από το ένζυμο DOT1L (Nguyen and Zhang 2011) και έχει βρεθεί πως βρίσκεται στις κωδικές περιοχές των ενεργών γονιδίων (Kouskouti and Talianidis 2005). Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως τα επίπεδα της τροποποίησης αυτής είναι υψηλά γύρω από το TSS και μειώνονται σημαντικά μετά το δεύτερο εξώνιο των γονιδίων (Jonkers et al. 2014). Παράλληλα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε γονίδια με υψηλό ρυθμό μεταγραφικής επιμήκυνσης (Veloso et al. 2014). Από την άλλη πλευρά, τρεις θέσεις μεθυλίωσης είναι συνδεδεμένες με τη μεταγραφική καταστολή: H3K9, H3K27, H4K20. Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση της H3K9 εμπλέκεται στη σίγαση ευχρωματινικών περιοχών καθώς και στη δημιουργία ετεροχρωματινής μέσω στρατολόγησης ενζύμων μεθυλοτρανσφερασών και της πρωτεΐνης HP1 (Kouzarides 2007). Η τροποποίηση H3K27me3 καταλύεται από την μεθυλοτρανσφεράση EZH2 του συμπλέγματος καταστολής Polycomb 2 (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2), το οποίο ανήκει στην εξελικτικά συντηρημένη ομάδα πρωτεϊνών Polycomb

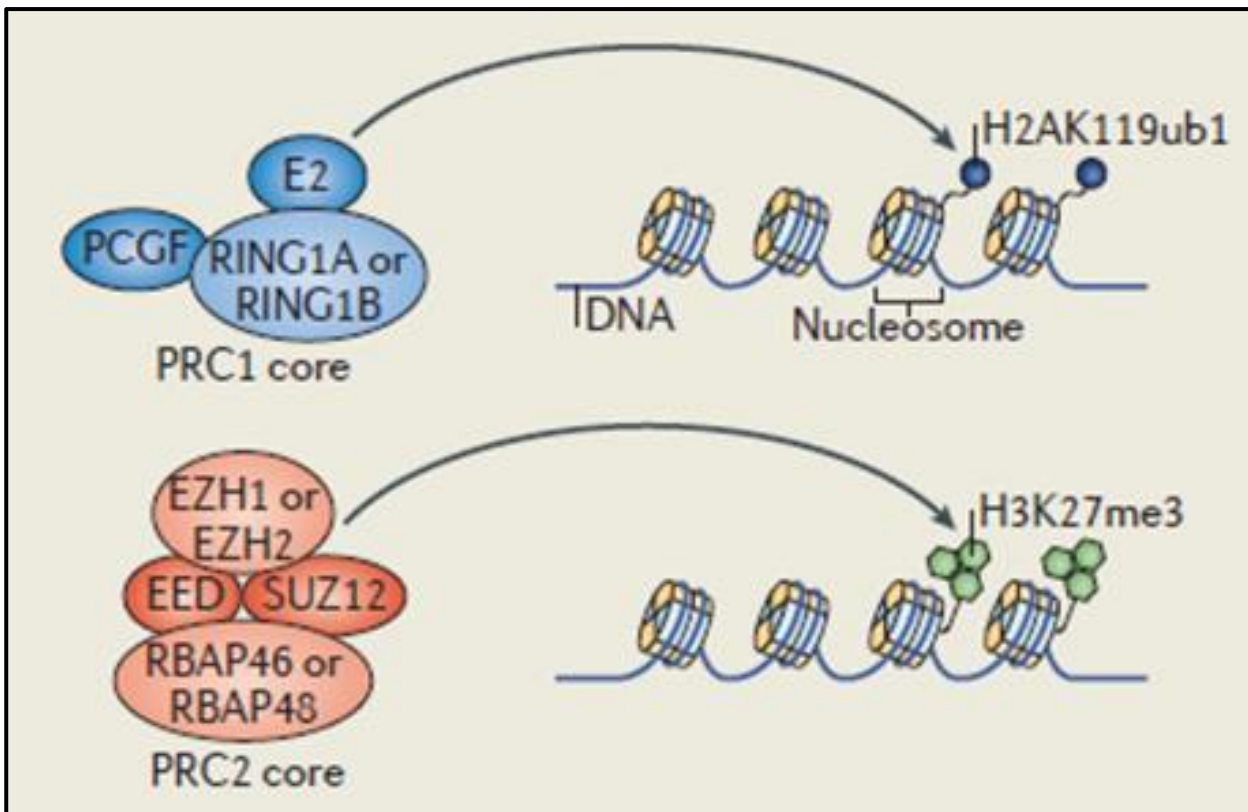
(Polycomb group proteins, PcG) οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Margueron and Reinberg 2011; Di Croce and Helin 2013a). Τέλος, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση H4K20me3 βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε περιοχές όπως τα τελομερή, εντυπωμένες (imprinted) γονιδιωματικές περιοχές, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και περιοχές ετεροχρωματίνης γύρω από το κεντρομερίδιο, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή της τροποποίησης αυτής στη μεταγραφική σίγαση (Jørgensen et al. 2013).

2.5.1.1 Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K27ac

Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K27ac είναι χαρακτηριστική των ενεργών υποκινητών και ενισχυτών (Shlyueva et al. 2014). Στον άνθρωπο, η τροποποίηση αυτή καταλύεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες p300 και CBP (Tie et al. 2009). Χαρακτηριστικά, έχει βρεθεί πως η ύπαρξη της H3K27ac μπορεί να διακρίνει ενεργούς από ανενεργούς υποκινητές σε βλαστοκύτταρα ποντικού (Creighton et al. 2010) και ανθρώπου (Rada-Iglesias et al. 2011), αντίστοιχα. Φαίνεται μάλιστα πως εμφανίζουν την συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση εκείνοι οι ανενεργοί ενισχυτές που ενεργοποιούνται κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Creighton et al. 2010; Rada-Iglesias et al. 2011). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η H3K27ac εμφανίζει ένα αμοιβαίως αποκλειόμενο πρότυπο πρόσδεσης στη χρωματίνη σε σχέση με την H3K27me3 (Tie et al. 2009; Vingron et al. 2010; Shlyueva et al. 2014), η οποία καταλύεται από το σύμπλεγμα καταστολής Polycomb 2 (βλέπε παρακάτω). Γενικότερα, ενώ η H3K27ac σχετίζεται με την ενεργό μεταγραφή, ο ακριβής ρόλος της στην μεταγραφική διαδικασία παραμένει ασαφής. Στην προσπάθεια αποσαφήνισης του ερωτήματος αυτού, πειράματα σε μονήρη κύτταρα αδενοκαρκινώματος έδειξαν πως τα επίπεδα της H3K27ac επιταχύνουν την μετάβαση της Pol II από την φάση έναρξης στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης και διευκολύνουν την πρόσδεση μεταγραφικών ενεργοποιητών στις περιοχές των υποκινητών (Stasevich et al. 2014). Από την άλλη μεριά, πειράματα στην *Drosophila* υποδεικνύουν πως η H3K27ac περιορίζεται στο να ανταγωνίζεται την H3K27me3 και δεν έχει κάποιον ρόλο, από μόνη της, στην μεταγραφή (Pengelly et al. 2013).

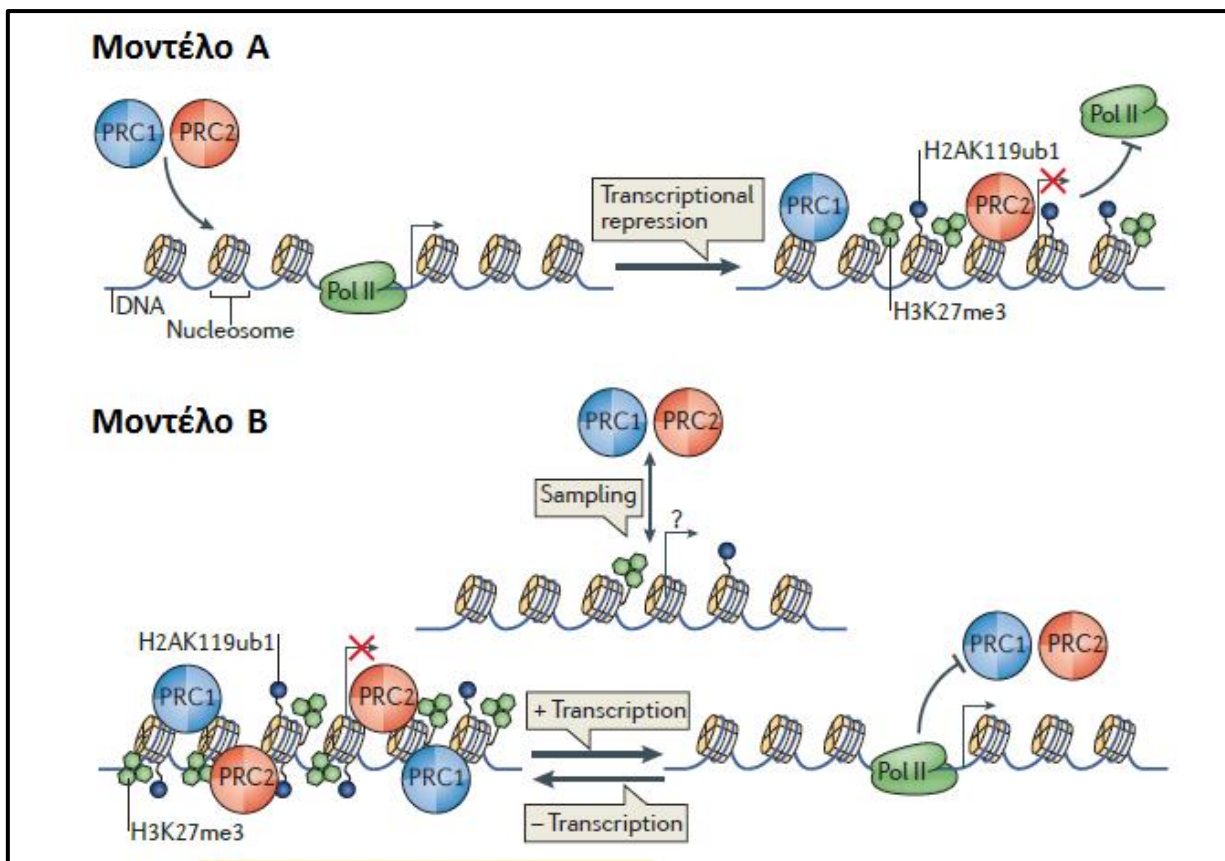
2.5.1.2 Οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος καταστολής Polycomb και η δράση τους στη χρωματίνη

Οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος καταστολής Polycomb (Polycomb Repressive Complex, PRC) περιγράφηκαν για πρώτη φορά στην *Drosophila melanogaster* ως σύμπλοκα πρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του σώματος της μύγας (Lewis 1978). Αντίστοιχα στα σπονδυλωτά και στον άνθρωπο φαίνονται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά την ανάπτυξη, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν απορυθμισμένη έκφραση σε πολλούς καρκίνους (Scelfo et al. 2015).



Εικόνα 9. Βασικές υπομονάδες των PRC1 και PRC2. Το PRC1 αποτελείται από τις λειτουργικά ισοδύναμες αλλά αμοιβαίως αποκλειόμενες υπομονάδες RING1A και RING1B, η οποίες λειτουργούν ως E3 λιγάσες ουβικιτίνης και είναι αυτές που μεταφέρουν και ενώνουν την ουβικιτίνη με την λυσίνη 119 της ιστόνης H2A (H2AK119ub). Οι RING1B ή RING1B αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα PCCF (στα σπονδυλωτά υπάρχουν 6 διαφορετικές PCCF, PCCG1-PCCF6). Το PRC2 αποτελείται από τις κύριες πρωτεϊνικές υπομονάδες EED, EZH1/EZH2, SUZ12, RBAP46/RBAP48. Υπεύθυνες για την μεθυλίωση του H3K27 είναι οι αμοιβαίως αποκλειόμενες υπομονάδες των EZH1 και EZH2. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του PRC2 βοηθούν στην σταθερότητα και ακεραιότητα του PRC2, ρυθμίζουν την ενζυματική του δραστηριότητα και καθορίζουν τα πρότυπα πρόσδεσης του στη χρωματίνη, μέσω αλληλεπιδράσεων που έχουν με άλλους βοηθητικούς παράγοντες που αποτελούν μέρη του PRC2 (ανατύπωση από Blackledge et al. 2015).

Συγκεκριμένα, η ομάδα των πρωτεϊνών Polycomb αποτελείται από δύο πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα: το Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) και το PRC2. Τα PRC1 και PRC2 διαθέτουν ενζυματικές ενεργότητες και καταλύουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συγκεκριμένες αμινοξικών καταλοίπων ιστονών. Το PRC1 έχει ενεργότητα λιγάσης ουβικιτίνης και καταλύει το σχηματισμό της H2AK119ub. Αντίστοιχα, το PRC2 είναι υπεύθυνο για την μεθυλίωση του H3K27 (H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3). Συνήθως, PRC1 και PRC2 φαίνονται να προσδένονται σε κοινές θέσεις στο γονιδίωμα δημιουργώντας περιβάλλον μεταγραφικής σίγασης (Blackledge et al. 2015). Τα PRC1 και PRC2 αποτελούνται από υπομονάδες κορμού (βλέπε Εικόνα 9) που είναι απαραίτητες για τις λειτουργίες τους. Εκτός από τις υπομονάδες αυτές, και άλλες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί να αποτελούν κομμάτι των PRC1 και PRC2 και πιστεύεται πως ρυθμίζουν την ειδικότητα της πρόσδεσης στη χρωματίνη και την ενζυματική ενεργότητα των PRC1 και PRC2 (Di Croce and Helin 2013b).



Εικόνα 10. Γονιδιακή ρύθμιση μέσω των πρωτεϊνών PRC. Σύμφωνα με το μοντέλο Α, οι πρωτεΐνες PRC στρατολογούνται στα γονίδια στόχους τους και εγκαθιδρύουν περιβάλλον μεταγραφικής σίγασης σε αυτά, μέσω της πρόσδεσης τους και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων H2AK119ub και H3K27me3 που καταλύουν τα PRC1 και PRC2 αντίστοιχα. Σύμφωνα με το μοντέλο Β, οι PRC1 και PRC2 πραγματοποιούν μια συνεχή «δειγματοληψία» στη χρωματίνη. Η παρουσία παραγόντων που σχετίζονται με την ενεργό μεταγραφή (πρόσδεση RNAPII, νεοσυντιθέμενο RNA, ιστονικές τροποποιήσεις που ευνοούν τη μεταγραφή), έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των PRC πρωτεϊνών από τη χρωματίνη και τη συνέχιση της μεταγραφής. Αντίθετα, η μεταγραφική σίγαση σε γονιδιωματικούς τόπους, επιτρέπει την πρόσδεση των PRC πρωτεϊνών, οι οποίες καταλύουν τις αντίστοιχες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (βλέπε εικόνα), προστατεύοντας από την στοχαστική μεταγραφική επανενεργοποίηση των συγκεκριμένων γονιδιωματικών περιοχών. Ανατύπωση από (Blackledge et al. 2015)

Η στρατολόγηση των PRC1, PRC2 στη χρωματίνη αλλά και ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να επιδρούν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών (Simon and Kingston 2013; Blackledge et al. 2015). Το κλασικό μοντέλο σχετικά με τη δράση των PRC πρωτεϊνών υποστηρίζει πως αυτές με τη στρατολόγησή τους στη χρωματίνη, δημιουργούν περιβάλλον μεταγραφικής σίγασης μέσω των ιστονικών τροποποιήσεων που καταλύουν, αναστέλλοντας τη δράση της Pol II στα γονίδια στόχους τους. Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα προτείνουν την αναθεώρηση του μοντέλου αυτού (βλέπε Εικόνα 10). Πειράματα σε κυτταρικές σειρές έδειξαν πως η εμφάνιση της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης H3K27me3 στο εσωτερικό του γονιδίου, δεν πυροδοτεί την μεταγραφική σίγαση αλλά είναι συνέπεια της (Hosogane et al. 2013, 2016). Στην ίδια κατεύθυνση, πειράματα που έγιναν σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα ποντικού (mouse embryonic stem cells, mESCs) έδειξαν πως αναστολή της μεταγραφής είναι ικανή να επιφέρει *de novo* στρατολόγηση του PRC2 σε γονίδια (Riising

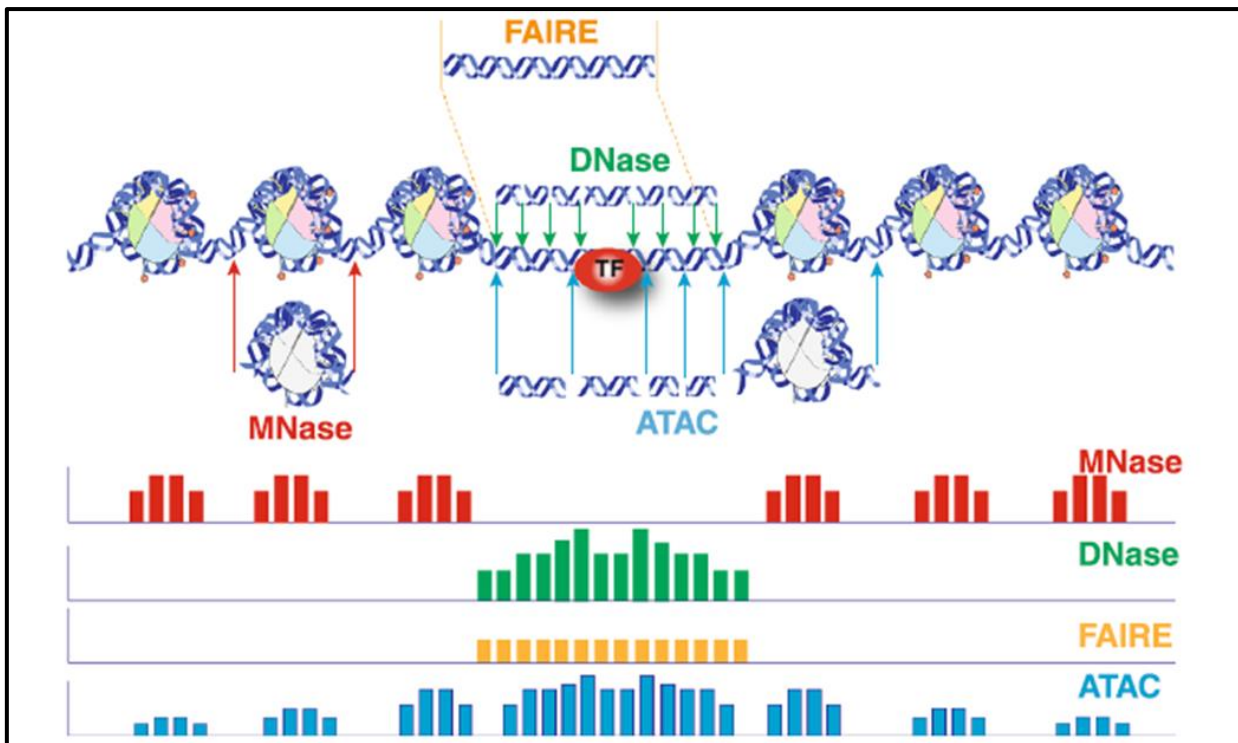
et al. 2014). Τα παραπάνω ευρήματα συνάδουν σε ένα μοντέλο όπου οι πρωτεΐνες PRC πραγματοποιούν μια συνεχή «δειγματοληψία» στη χρωματίνη και ανταποκρίνονται στη μεταγραφική κατάσταση των διάφορων γενετικών τόπων. Για παράδειγμα, χαρακτηριστικά ενεργούς μεταγραφής, όπως η πρόσδεση της Pol II σε γονίδια και η σύνθεση RNA και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με την ενεργοποίηση της μεταγραφής, θα μπορούσαν να μειώνουν τη δραστικότητα και τον χρόνο παραμονής των πρωτεϊνών PRC στα ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια και να περιορίζουν τη δράση τους σε γενετικούς τόπους που ήδη βρίσκονται σε καθεστώς σίγασης.

Σε συσχέτιση με τα προηγούμενα, έχει βρεθεί πως το PRC2 μπορεί να προσδένεται με το RNA (Davidovich et al. 2013; Cifuentes-Rojas et al. 2014; Beltran et al. 2016), μέσω της υπομονάδας του SUZ12 (Beltran et al. 2016). Οι παραπάνω μελέτες προτείνουν πως τα νεοσυντιθέμενα μετάγραφα που παράγονται από τα ενεργά γονίδια μπορούν να δρουν ως «δόλωμα», αναστέλλοντας την σταθερή πρόσδεση μεταξύ PRC2 και χρωματίνης, προστατεύοντας έτσι τα ενεργά γονίδια από τη δράση του PRC2 και περιορίζοντάς την σε μεταγραφικά ανενεργές περιοχές του γονιδιώματος.

2.5.2 Προσβασιμότητα της χρωματίνης και μεταγραφή

Η θέση των νουκλεοσωμάτων διαδραματίζει σπουδαίο ρυθμιστικό ρόλο στην μεταγραφική ενεργοποίηση καθώς ρυθμίζει *in vivo* τη διαθεσιμότητα των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών ρυθμιστικών παραγόντων (Transcription Factors, TFs) και των υπόλοιπων συμπλόκων της μεταγραφής. Έτσι, οι «ανοιχτές» ή προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης θεωρούνται ως κύριες γονιδιωματικές ρυθμιστικές περιοχές (John et al. 2011) και χαρακτηρίζονται από υπεραισθησία σε πέψη από νουκλεάση (nuclease hypersensitivity sites) (Gross 1988). Η ανάγκη για μελέτη των «ανοιχτών» ρυθμιστικών περιοχών της χρωματίνης οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων που μπορούν να αποτυπώσουν τις περιοχές αυτές σε γονιδιωματικό επίπεδο. Τέτοιες τεχνικές αποτελούν οι MNase-seq, DNase-seq, FAIRE-seq, ATAC-seq καθεμιά από τις οποίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Tsomprana and Buck 2014). Στην Εικόνα 11 απεικονίζονται ενδεικτικά τα τμήματα του γονιδιώματος που μπορούν να αποτυπωθούν από τις τεχνικές αυτές.

Η σημασία των περιοχών αυτών έχει κεντρίσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον διαφόρων επιστημονικών ομάδων καθώς αλλαγές στην προσβασιμότητα της χρωματίνης σε ρυθμιστικές γονιδιωματικές περιοχές έχουν συνδεθεί με διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση (Murtha et al. 2015; Maezawa et al. 2017; de la Torre-Ubieta et al. 2018) ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός (Li et al. 2017; Wapinski et al. 2017) , ο καρκίνος (Davie et al. 2015) αλλά και η απόκριση σε γενοτοξικούς παράγοντες (Schick et al. 2015).



Εικόνα 11. Κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αποτύπωση και ποσοτικοποίηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης. Στην εικόνα παρουσιάζεται ενδεικτικά το σήμα που αναμένεται από την καθεμιά από ένα ενδεικτικό κομμάτι χρωματίνης. TF: Μεταγραφικός παράγοντας (ανατύπωση από Tsomprana and Buck 2014).

Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί πως, παρά τη σημαντικότητα της χρωματίνης και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών στις διάφορες κυτταρικές διαδικασίες και αποκρίσεις (Κεφάλαια 2.5.1, 2.5.2), ο τρόπος με τον οποίο διαμορφώνεται η χρωματίνη στις διάφορες ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος, έπειτα από έκθεση σε UV ακτινοβολία, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

2.5.3 UV ακτινοβολία και μεταγραφή

Το μεταγραφικό στρες που προκαλείται στα κύτταρα μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, μπορεί να αναλυθεί σε δύο επίπεδα. Αφενός, οι βλάβες που προκαλούνται από την UV αποτελούν εμπόδιο για την προώθηση της μεταγραφικά συζευγμένης Pol II (Pol II-ser2P). Αφετέρου, η UV ακτινοβολία οδηγεί σε μια ευρύτερη μεταγραφική αναδιοργάνωση, όπως αντίστοιχα συμβαίνει στις περιπτώσεις του θερμικού ή του οξειδωτικού στρες. Ταυτόχρονα, αξίζει να τονιστεί πως η επιδιόρθωση των βλαβών στα μεταγραφόμενα γονίδια, πυροδοτείται από την παρεμπόδιση της προώθησης της Pol II, η οποία οδηγεί και στην στρατολόγηση των παραγόντων του TC-NER μονοπατιού επιδιόρθωσης (βλέπε Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.2.2).

Όπως γίνεται φανερό από τα συμπτώματα των συνδρόμων που σχετίζονται με ελαττωματικό μηχανισμό NER, και ιδιαίτερα αυτών του CS όπου μόνο το επιδιορθωτικό μονοπάτι TC-NER είναι μη λειτουργικό (βλέπε παραπάνω), η παρατεταμένη παρεμπόδιση της μεταγραφής έχει καταστροφικές συνέπειες για

την ομαλή λειτουργία και ανάπτυξη του οργανισμού. Μια τέτοια παρεμπόδιση μπορεί να επηρεάσει α) τη μεταγραφική ισορροπία του κυττάρου, αφού καταστέλλεται η μεταγραφή σημαντικών γονιδίων και εμποδίζονται νέοι μεταγραφικοί κύκλοι και, β) τη γονιδιωματική ακεραιότητα, καθώς η παρεμπόδιση της προώθησης της Pol II μπορεί να οδηγήσει σε σύγκρουση μεταξύ των συμπλόκων μεταγραφής και αντιγραφής και θραύση της διπλής έλικας του DNA (García-Muse and Aguilera 2016).

2.5.3.1 Η τύχη της «μπλοκαρισμένης» Pol II

Πρώιμα πειράματα *in vitro* έδειξαν πως η Pol II μπορεί να παραμείνει στα CPDs για 20 ώρες (Selby et al. 1997) ενώ σε κύτταρα ποντικού που έχουν έλλειψη της πρωτεΐνης Csb, έχει βρεθεί πως η Pol II μπορεί να μείνει «μπλοκαρισμένη» σε βλάβες CPD για περισσότερο από 48 ώρες *in vivo* (Garinis et al. 2009). Από στερεοδομικής πλευράς έχει βρεθεί ότι το «αποτύπωμα» ενός μορίου Pol II που σταματά σε ένα CPD εκτείνεται 10 βάσεις μετά από το CPD και 25 βάσεις πριν από αυτό (Tornaletti et al. 1999), με άλλα λόγια φέρεται πως η Pol II καλύπτει τη βλάβη. Δεδομένου πως ο επιδιορθωτικός μηχανισμός απαιτεί πρόσβαση στη βλάβη ώστε να δράσει, καθίσταται αναγκαία η απομάκρυνση της Pol II από αυτήν με κάποιον τρόπο. Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για την τύχη της σταματημένης Pol II στις περιοχές των βλαβών. Σύμφωνα με ένα από αυτά, η Pol II που βρίσκεται στις βλάβες γίνεται στόχος ουβικιτίνωσης και ακολούθως απομακρύνεται και αποικοδομείται (Bregman et al. 1996). Σε συμφωνία με το μοντέλο αυτό, μια πρόσφατη έρευνα προτείνει πως για την πλήρη επιδιόρθωση των γονιδίων μέχρι το 3' άκρο τους, απαιτείται συνεχόμενη τροφοδότηση με μόρια Pol II επιμήκυνσης, δεδομένου πως το κάθε μόριο Pol II που θα συναντήσει κάποια βλάβη θα απομακρυνθεί μέσω ουβικιτίνωσης (Chiou et al. 2018). Με βάση το μοντέλο αυτό, την επιδιόρθωση της επόμενης βλάβης στο γονίδιο θα την επιτελέσει η Pol II που έπεται. Ωστόσο, άλλες μελέτες προτείνουν πως ο μηχανισμός αυτός είναι πιθανός ως «έσχατη λύση», όταν δηλαδή είναι αδύνατη η επιδιόρθωση των βλαβών και η επανάκτηση της μεταγραφικής ισορροπίας (Woudstra et al. 2002; Anindya et al. 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ουβικιτίνωση αυτή της Pol II επιτελείται από την πρωτεΐνη Nedd4 (Anindya et al. 2007) σε συνδυασμό με το σύμπλοκο Elongin A/B/C – Cullin 5 (Yasukawa et al. 2008; Harreman et al. 2009).

Το δεύτερο μοντέλο που υπάρχει σε σχέση με την απομάκρυνση της Pol II από τις βλάβες, υποστηρίζει πως η Pol II οπισθοχωρεί από την περιοχή της βλάβης, δίνοντας πρόσβαση στους επιδιορθωτικούς παράγοντες ώστε να επιτελέσουν τη λειτουργία τους. Η οπισθοχώρηση αυτή συνοδεύεται από ενεργοποίηση της νουκλεολυτικής ενεργότητας της Pol II, η οποία αποκόπτει το προεξέχον κομμάτι του νεοσυντιθέμενου μεταγράφου (μετά την οπισθοχώρηση της), επιτρέποντας έτσι την απελευθέρωση του ενεργού της κέντρου και την ομαλή επανέναρξη της μεταγραφής όταν οι βλάβες αποκατασταθούν (Hanawalt and Spivak 2008a; Vermeulen and Fousteri 2013b). Σε όλη αυτήν τη διαδικασία, σημαντικό ρόλο πιστεύεται πως διαδραματίζει ο παράγοντας TFIIIS, ο οποίος επάγει την νουκλεολυτική ενεργότητα της Pol II (Donahue et al. 1994; Sigurdsson et al. 2010) και συνεντοπίζεται με την Pol II στις περιοχές των

βλαβών (Fousteri et al. 2006b). Ακόμη, μείωση των επιπέδων του TFIIIS έχει βρεθεί πως οδηγεί σε μη ομαλή ανάκαμψη της μεταγραφής των κυττάρων μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία (Jensen and Mullenders 2010). Η οπισθοχώρηση της Pol II από την περιοχή της βλάβης απαιτεί, για στερεοδομικούς λόγους, χαλάρωση της δομής της χρωματίνης πίσω από την πολυμεράση, ώστε να μπορεί να γίνει η ολίσθηση προς τα πίσω. Έχει προταθεί πως πρωτεΐνες όπως η p300 και η HMGN1, μπορεί να τροποποιούν τα νουκλεοσώματα όπισθεν της σταματημένης στη βλάβη Pol II, δημιουργώντας μια πιο χαλαρή δομή, ώστε να διευκολύνουν την διαδικασία αυτή (Hanawalt and Spivak 2008a).

Τέλος, μελέτες τόσο σε ανθρώπινα κύτταρα (Marietta and Brooks 2007) όσο και στον *S. cerevisiae* (Walmacq et al. 2012), έδειξαν πως η Pol II έχει τη δυνατότητα να μεταγράφει σε υποστρώματα που περιέχουν βλάβες (translesion transcription/synthesis), οδηγώντας στην παραγωγή μεταλλαγμένων μεταγράφων. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την παρατεταμένη παραμονή της Pol II στις βλάβες απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης CSB, δείχνουν πως πιθανώς η ικανότητα αυτή της Pol II να συνεχίζει τη μεταγραφή παρουσία των βλαβών, εξαρτάται από την πρωτεΐνη CSB. Γενικότερα, φαίνεται πως σε κάποιες περιπτώσεις τα κύτταρα προτιμούν να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς που θα επιφέρουν μεταγραφική μεταλλαξιγένεση, από το να υποστούν το εξαιρετικά τοξικό παρατεταμένο σταμάτημα της Pol II στις βλάβες.

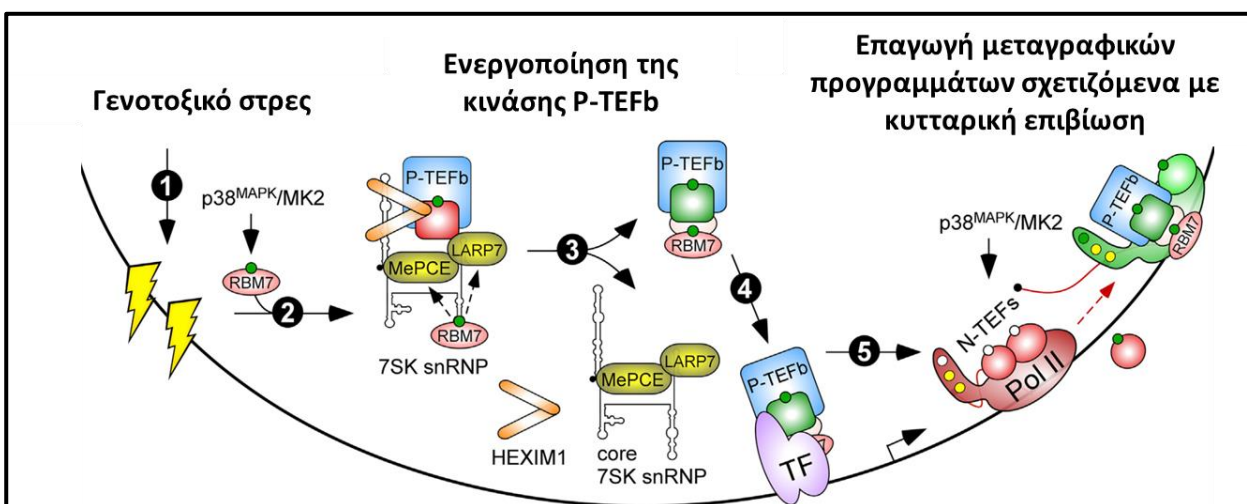
2.5.3.2 Η μεταγραφική αναδιοργάνωση ως συνέπεια της έκθεσης σε UV ακτινοβολία

Στην προσπάθεια αποσαφήνισης της μεταγραφικής αναδιοργάνωσης που παρατηρείται μετά από την έκθεση σε UV ακτινοβολία, σπουδαίο ρόλο έπαιξε η εισαγωγή των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η οποία επέτρεψε τη μελέτη των διάφορων μεταγραφικών διαδικασιών σε γονιδιωματικό επίπεδο. Ωστόσο, η βάση για τις μελέτες αυτές είχε θεμελιωθεί από βασικά βιοχημικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα, όσο και σε κύτταρα ασθενών XP και CS.

Το γεγονός ότι η UV επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό της διαδικασίες της μεταγραφής έγινε αρχικά αντιληπτό από πειράματα τα οποία έδειξαν πως τα επίπεδα του νεοσυντιθέμενου RNA (nascent RNA, nRNA) παρουσιάζουν πτώση στα κύτταρα, μετά από έκθεση σε UV (Mayne and Lehmann 1982; Rockx et al. 2000). Μάλιστα, ένα σημαντικό γνώρισμα των κυττάρων CS αποτελεί το γεγονός πως τα επίπεδα των νεοσυντιθέμενων RNA μετά την ακτινοβόληση, αδυνατούν να επανέλθουν, σε αυτά πριν της ακτινοβόλησης, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία μπορούν και επανακάμπτουν (Mayne and Lehmann 1982). Σε αντιστοιχία, βρέθηκε πως σε πυρηνικά εκχυλίσματα τα επίπεδα της Pol II-ηγο μειώνονται μετά από έκθεση σε UV, ενώ εκείνα της υπερφωσφορυλιωμένης Pol II αυξάνονται. Τα επίπεδα της Pol II-ηγο αυξάνονται πάλι 6 ώρες μετά την ακτινοβόληση ενώ αυτό δεν παρατηρείται σε κύτταρα ασθενών CS-B, CS-A και XP-A (Rockx et al. 2000). Τα τελευταία ευρήματα φαίνεται να

επιβεβαιώνονται από πρόσφατα πειράματα που βασίστηκαν σε τεχνικές CHIP-seq (Gyenis et al. 2014; Lavigne et al. 2017), GRO-seq (Williamson et al. 2017) και Bru-seq (Andrade-Lima et al. 2015) και τα οποία μελέτησαν όχι μόνο τα επίπεδα των διαφόρων ισομορφών της Pol II, αλλά και την γονιδιωματική κατανομή τους πριν και μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Ειδικότερα, βρέθηκε πως η Pol II φαίνεται να μειώνεται στις περιοχές που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων μετά από έκθεση σε UV (Gyenis et al. 2014; Lavigne et al. 2017).

Η μείωση της Pol II-ηγο φαίνεται πως οφείλεται στη γρήγορη υπερφωσφορυλίωση του μορίου της και την απελευθέρωσή του από τις θέσεις PPP στη φάση της παραγωγικής επιμήκυνσης (Lavigne et al. 2017; Borisova et al. 2018). Η απελευθέρωση της Pol II από τις θέσεις PPP μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία, φαίνεται να ελέγχεται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK p38 (Borisova et al. 2018; Bugai et al. 2019), το οποίο δρα σε πολλαπλά επίπεδα (βλέπε εικόνα 12). Συγκεκριμένα, η εξαρτώμενη από UV και επαγόμενη από p38 MAPK φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RBM7, συντελεί στην αυξημένη αλληλεπίδρασή της με την ριβονουκλεοπρωτεΐνη 7SK RNP, οδηγώντας στην απελευθέρωση της κινάσης P-TEFb από το 7SK RNP σύμπλοκο που συνεπάγεται αύξηση των διαθέσιμων πηγών ενεργής P-TEFb στον πυρήνα (Bugai et al. 2019). Ταυτόχρονα, πειράματα πρωτεομικής έδειξαν πως η έκθεση σε UV οδηγεί σε μια p38 εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των διαφόρων υπομονάδων της πρωτεΐνης NELF στη χρωματίνη, η οποία συνοδεύεται από είσοδο των μορίων της Pol II στη φάση της επιμήκυνσης της μεταγραφής (Borisova et al. 2018). Τα πρόσφατα αυτά ευρήματα ήρθαν να συμπληρώσουν παλαιότερες σχετικά μελέτες οι οποίες έδειξαν πως η έκθεση σε UV αύξάνει τα διαθέσιμα ενεργά επίπεδα της κινάσης P-TEFb (Chen et al. 2008), η οποία όπως προαναφέρθηκε, είναι υπεύθυνη για τη μετάβαση του μορίου της Pol II από τις θέσεις PPP σε εκείνες της μεταγραφικής επιμήκυνσης.



Εικόνα 12. Μηχανισμός της απελευθέρωσης της Pol II στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης έπειτα από έκθεση σε UV. Κυρίαρχο ρόλο στην απόκριση φαίνεται να έχει το μονοπάτι p38 MAPK το οποίο φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη RBM7, αυξάνοντας την αλληλεπίδρασή της με τις υπομονάδες LARP7 και MePCE του 7SK snRNP ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλέγματος. Η αλληλεπίδραση αυτή απελευθερώνει την κινάση P-TEFb από το 7SK

snRNP, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίησή της. Η κινάση P-TEFb φωσφορυλιώνοντας τους παράγοντες NELF και DSIF, αλλά και την RNAPII στην Ser2 του CTD, οδηγεί στην απελευθέρωση Pol II μορίων στη φάση της παραγωγικής επιμήκυνσης. Τροποποίηση από Bugai et al. 2019.

Ειδικότερα, ο ρυθμός της προώθησης της Pol II-ser2P στα γονίδια μετά την έκθεση σε UV, γίνεται με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με φυσιολογικές συνθήκες (Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017). Στο ίδιο πλαίσιο, έχει προταθεί πως η απελευθέρωση της Pol II από τις PPP θέσεις στην παραγωγική φάση της επιμήκυνσης, μέσω της Ser2 φωσφορυλίωσης του μορίου της Pol II, εξυπηρετεί τη γρήγορη ανίχνευση και επιδιόρθωση των βλαβών στο μεταγραφόμενο γονιδίωμα μέσω του μονοπατιού TCR (Lavigne et al. 2017). Γενικότερα το στάδιο επιμήκυνσης της μεταγραφής φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από το αντίστοιχο στάδιο της έναρξης μετά τη UV καθώς πειράματα GRO-seq (Williamson et al. 2017) και Bru-seq (Andrade-Lima et al. 2015) έδειξαν πως στο 5' άκρο των γονιδίων εντοπίζεται μεταγραφική δραστηριότητα (εντοπίζοντάς την ως νεοσυντιθέμενο RNA), σε αντίθεση με το αντίστοιχο σήμα στο 3' άκρο των γονιδίων, όπου η δραστηριότητα αυτή φαίνεται αρκετά μειωμένη. Ακόμη, ένα ακόμη δεδομένο που υποστηρίζει τη διατήρηση της ενεργότητας των TSS περιοχών μετά την έκθεση σε UV είναι η διατήρηση των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές (Heine et al. 2008; Gyenis et al. 2014).

Από την άλλη μεριά, δεν θα μπορούσαν να παραβλεφθούν δεδομένα από μελέτες που δείχνουν πως η μεταγραφική διαδικασία αναστέλλεται μετά από έκθεση σε UV. Για παράδειγμα, η μείωση του σήματος της Pol II στις περιοχές των υποκινητών αποδίδεται από τους Gyenis et al. 2014 σε έναν γρήγορο μηχανισμό που δρα γενικευμένα στο σύνολο των υποκινητών των ενεργών γονιδίων, ο οποίος απομακρύνει τα υπάρχοντα Pol II μόρια από τις αντίστοιχες γονιδιωματικές θέσεις και παράλληλα εμποδίζει την επαναπρόσδεση τους. Η ίδια μελέτη αναφέρει πως στην αναστολή της μεταγραφικής έναρξης μετά τη UV, συντελεί η στρατολόγηση του παράγοντα TFIID (ο οποίος σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στους υποκινητές, βοηθώντας στο στάδιο έναρξης της μεταγραφής) σε περιοχές εσωτερικά των γονιδίων, ως μέρος του μηχανισμού NER με σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών. Ακόμη, πειράματα που έγιναν σε ινδοβλάστες δέρματος έδειξαν πως η μεταγραφική αυτή αναστολή, αποδίδεται στην υπερέκφραση και πρόσδεση της πρωτεΐνης ATF3 στις περιοχές υποκινητών μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων (4988 γονίδια), προκαλώντας μείωση της έκφρασης τους μετά την έκθεση σε UV (Kristensen et al. 2013; Eranchintsev et al. 2017). Μάλιστα, έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη ATF3 αποκοιδομεύεται μέσω πρωτεασώματος, με έναν CSA/CSB εξαρτώμενο τρόπο, γεγονός που αποκαθιστά την επανέναρξη της μεταγραφής σε φυσιολογικά κύτταρα (Eranchintsev et al. 2017).

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές πως, η πρόοδος που επιτεύχθηκε στο πεδίο της μεταγραφικής απόκρισης των κυττάρων στην UV ακτινοβολία, με την εισαγωγή των τεχνολογιών NGS, δημιούργησε έναν μεγάλο όγκο ευρημάτων, οδηγώντας στην ανάπτυξη, φαινομενικά, αντικρουόμενων θεωριών. Για

τον λόγο αυτό, καθίσταται αναγκαία η ύπαρξη μιας μελέτης, που να παρέχει μηχανιστικές λεπτομέρειες και να εξηγεί τα μοριακά φαινόμενα που παρατηρούνται στα κύτταρα, μετά από έκθεση σε UV, θέτοντας παράλληλα τις βάσεις για τη δημιουργία ενός ενιαίου μοντέλου μεταγραφικής απόκρισης των κυττάρων στο γενοτοξικό στρες.

3 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Αδιαμφισβήτητητα, η μεταγραφή αποτελεί μια κυτταρική διαδικασία η οποία διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη διασφάλιση της γονιδιωματικής ακεραιότητας. Η πρόοδος που επιτεύχθηκε τα τελευταία χρόνια με την βοήθεια των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), αποκάλυψε πως βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων οδηγούν σε μια πολυεπίπεδη κυτταρική απόκριση που συμπεριλαμβάνει αλλαγές στο πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων και στοχεύει στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούν διακοπή της μεταγραφής.

Παρόλο που η επιδιόρθωση, μέσω του TC-NER μονοπατιού, εξαρτάται από την μεταγραφή μέσω της Pol II, οι έρευνες που μέχρι πρόσφατα εξέταζαν το πώς και σε ποια στάδια το στρες της UV επηρεάζει τη μεταγραφή, οδηγούσαν σε ένα μοντέλο όπου εκτός από την παροδική παρεμπόδιση της μεταγραφικής επιμήκυνσης, η UV φαινόταν να αναστέλλει και το στάδιο έναρξης της μεταγραφής. Το μοντέλο αυτό βασίστηκε σε ευρήματα που έδειξαν πως τα επίπεδα αλλά και η πρόσδεση της Pol II-ηγο μειώνονται στη χρωματίνη λίγο μετά την ακτινοβολία με UV, οδηγώντας στην υπόθεση πως οι υποκινητές μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία «κλείνουν», καταστέλλοντας νέα συμβάντα έναρξης της μεταγραφής. Από την άλλη μεριά, πρόσφατα πειράματα βασισμένα σε τεχνολογίες NGS αποκάλυψαν μια εξαρτώμενη από την UV, αύξηση του nRNA σε περιοχές των γονιδίων πλησίον του TSS (Andrade-Lima et al. 2015; Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν πως η έναρξη της μεταγραφής θα μπορούσε να μην επηρεάζεται τόσο σοβαρά από την έκθεση σε UV, όσο πιστευόταν μέχρι τώρα. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, πρόσφατα ευρήματα στο εργαστήριο μας έδειξαν πως στα ενεργά γονίδια, μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία, μόρια Pol II-ser2P απελευθερώνονται από τις PPP θέσεις, δημιουργώντας ένα μεταγραφικό κύμα που «σαρώνει» τα ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια στοχεύοντας στη γρήγορη επιδιόρθωση των βλαβών (Lavigne et al. 2017).

Για την αποσαφήνιση του σκοπού της διατριβής αυτής θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν ακόμη δύο δεδομένα. Πρώτον, η αλληλεξάρτηση μεταγραφής και χρωματίνης και δεύτερον, το γεγονός ότι η μεταγραφή ως διαδικασία δεν περιορίζεται στα γονίδια αλλά ανιχνεύεται και σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος όπως τα PROMPTs και οι ενεργοί ενισχυτές. Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν αφενός η μελέτη της χρωματίνης (μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και προσβασιμότητας) στις γονιδιωματικές περιοχές των TSS γονιδίων, PROMPTs και ενισχυτών μετά από UV, αφετέρου η αποσαφήνιση του μηχανισμού μοριακών φαινομένων που σχετίζονται με το στάδιο έναρξης της μεταγραφής (μείωση επιπέδων Pol II-ηγο, σύνθεση RNA σε περιοχές έναρξης της μεταγραφής), μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Για την αποσαφήνιση των ανωτέρω ερωτημάτων η παρούσα διατριβή εστίασε σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος, ενώ παράλληλα αναλύθηκαν συγκεκριμένες μετα-

μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών καθώς και οι δυναμικές της έναρξης της μεταγραφής ως απόκριση στη UV ακτινοβολία, σε ινοβλάστες δέρματος ασθενών CS-B.

4 Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα διατριβή, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών δέρματος ακροβυστίας ανθρώπου (Vh10 normal human foreskin fibroblasts (Kolman and Bohužová 1992)), καθώς και σε ινοβλάστες δέρματος CS-B ασθενών (Arlett et al. 2008; Nardo et al. 2009b). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν έχουν αθανатоποιηθεί με τη μέθοδο human telomerase reverse transcriptase (hTert) (Lee et al. 2004). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Scientific) εμπλουτισμένο με 10% v/v εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS, Thermo Scientific) και 1% v/v πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Thermo Scientific). Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) 5%. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, όλα τα στάδια της οποίας πραγματοποιήθηκαν μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow):

- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων.
- Προσθήκη 10ml Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x.
- Απομάκρυνση του PBS.
- Προσθήκη 3ml διαλύματος τρυψίνης – EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Thermo Scientific) και επώαση για 3 περίπου λεπτά στον επωαστικό κλίβανο των 37°C, με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια των πιάτων/φλασκών όπου βρίσκονται προσκολλημένα.
- Προσθήκη 7ml θρεπτικού υλικού DMEM για απενεργοποίηση της τρυψίνης και προσεκτική ανάμιξη των κυττάρων μέχρι να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα.
- Ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε νέες φλάσκες/πιάτα, όπου συμπληρώνεται η κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού.

4.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυτταρικών σειρών

Για την κατάψυξη κυτταρικών σειρών ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία (ανακαλλιέργεια) η οποία διαφοροποιείται μετά την αποκόλληση των κυττάρων και την προσθήκη ποσότητας DMEM ως εξής:

- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon 15ml και κατόπιν πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στη συνέχεια το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό κατάψυξης (freezing medium) το οποίο περιέχει 90% v/v FBS και 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO).

- Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικά φυαλίδια ψήξης (cryotubes) τα οποία τοποθετούνται αρχικά στον πάγο και έπειτα σε καταψύκτη -80°C , απ' όπου μεταφέρονται εντός 48 ωρών σε δεξαμενές αποθήκευσης υγρού αζώτου (liquid N_2) για μακροχρόνια φύλαξη.

Για την απόψυξη των κυττάρων η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

- Τα cryotubes που περιέχουν τα κύτταρα μεταφέρονται από τις δεξαμενές αποθήκευσης υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο 37°C για μερικά λεπτά, έως ότου ξεπαγώσουν.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon 15ml, ο οποίος περιέχει 5ml θρεπτικό υλικό DMEM.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά στους 4°C και κατόπιν απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού και το εναιώρημα διαμοιράζεται σε κατάλληλο αριθμό φιασκών καλλιέργειας.

4.3 Απομόνωση ιστονών

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πάγο και κατόπιν ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS 1x. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων σε διάλυμα PBS 1x που περιέχει 1mM EDTA, 0.5mM EGTA (Egtazic Acid) και 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε όγκο PBS 1x δεκαπλάσιο από τον όγκο του και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά στους 4°C . Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10 όγκους Lysis Buffer (10mM HEPES PH 7.9, 1.5mM MgCl_2 , 10mM KCl, 0.5M Dithiothreitol (DTT), 1.5mM PMSF) και στη συνέχεια προστέθηκε θειικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 0.2M. Τα δείγματα επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στα $10,080 \times g$ για 10 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και σε αυτό προστέθηκε τριχλωροξικό οξύ (TCA) σε τελική συγκέντρωση 20%. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και στη συνέχεια επώαστηκαν για μια ώρα στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1 ml κρύας ακετόνης (-20°C). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο που περιέχει ακετόνη. Τέλος, η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE (10 mM Tris, 1mM EDTA) και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C .

4.4 Διασύνδεση DNA - πρωτεϊνών με φορμαλδεΐδη (*In vivo* crosslinking)

Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στους 4°C και στο θρεπτικό τους υλικό προστέθηκε φορμαλδεΐδη σε τελική συγκέντρωση 1% (από διάλυμα stock 37%). Έπειτα από επώαση για 12 λεπτά, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε γλυκίνη (stock 2.5 M) σε τελική συγκέντρωση 0.125 M για 6 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS 1x και αφού συλλέχθηκαν σε PBS 1x που περιέχει 1mM EDTA, 0.5mM EGTA και 1 mM PMSF, χωρίστηκαν σε πελέτες των $2 \cdot 10^7$ κυττάρων ανά πειραματική συνθήκη, παγώθηκαν ακαριαία σε υγρό άζωτο και τέλος, διατηρήθηκαν στους -80°C.

4.5 Κυτταρομετρία ροής

Η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της φάσης του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων, όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος χρώσης του προπιούχου ιωδίου (Propidium Iodide, PI). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα PBS 1x το οποίο περιείχε 0.1% γλυκόζη και 70% αιθανόλη και στη συνέχεια επώαστηκαν για 24 ώρες στους -20 °C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1500 rpm, στους 4°C και πραγματοποιήθηκε πλύση με κρύο PBS 1x. Αφού πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1500 rpm, στους 4°C, τα δείγματα επώαστηκαν με διάλυμα PI (SIGMA, P4864) συγκέντρωσης 50 µg/ml. Έπειτα, στα δείγματα προστέθηκαν 100 µg/ml RNase A (Thermo Fischer Cat. No. 12091021) και το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε κατάλληλα σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής, όπου και πραγματοποιήθηκε επώαση στο σκοτάδι για 40 λεπτά. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του μηχανήματος FACS Canto II (BD Biosciences) και του λογισμικού FACSDiva software (Version 6.0; BD Biosciences).

4.6 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Κυτταρικά ιζήματα αποτελούμενα από $2 \cdot 10^7$ κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1,5ml διαλύματος Chro-Lysis (50mM Hepes-KOH pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 140mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% IGEPAL, 0.25% Triton X-100, 1mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C με περιστροφή σε κατάλληλο μηχάνημα (rotator). Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2800rpm για 10 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο (που αντιπροσωπεύει το διαλυτό περιεχόμενο κυτταροπλάσματος και πυρήνα) απομακρύνθηκε και τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν εκ νέου σε 1,5ml διαλύματος Wash Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 200mM NaCl, 1mM PMSF, 10mM NaPy, αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθως, τα δείγματα επώαστηκαν πάλι για 10 λεπτά στους 4°C με περιστροφή και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου στις 2800rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 700µl διαλύματος RIPA (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 140mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM PMSF,

10mM NaPy, αναστολείς πρωτεασών) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατακερματισμός της χρωματίνης με χρήση υπερήχων (sonication) χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Bioruptor Sonicator (Diagenode) σε υδατόλουτρο πάγου. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα για 25 λεπτά (2 κύκλοι sonication των 12.5 λεπτών) με τη ρύθμιση 30 δευτερόλεπτα ενεργός (ON)/30 δευτερόλεπτα ανενεργός (OFF). Μετά την περάτωση της ανωτέρω διαδικασίας τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000rpm για 10 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια το υπερκείμενο φυλάχθηκε ως διαλυτοποιημένο κλάσμα χρωματίνης (Input). Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε στους 4°C για 16 ώρες, επώάζοντας ίσες ποσότητες χρωματίνης ανά πειραματική συνθήκη (π.χ. μη ακτινοβολημένα/ακτινοβολημένα κύτταρα) με κατάλληλη ποσότητα επιθυμητού αντισώματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα CHIP πειράματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Αντίσωμα	Εταιρεία	Catalogue Number
anti-H3K27ac	Abcam	ab4729
anti-H3K27me3	Millipore	07-449
anti-Pol II-hypo (8WG16)	Millipore	05-952
anti-Pol II-Ser2P	Abcam	ab5095
anti-EZH2	Cell Signaling	5246S
anti-H3K79me2	Cell Signaling	5427S

Πίνακας 3. Καταγραφή αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα CHIP-seq πειράματα της παρούσας διατριβής.

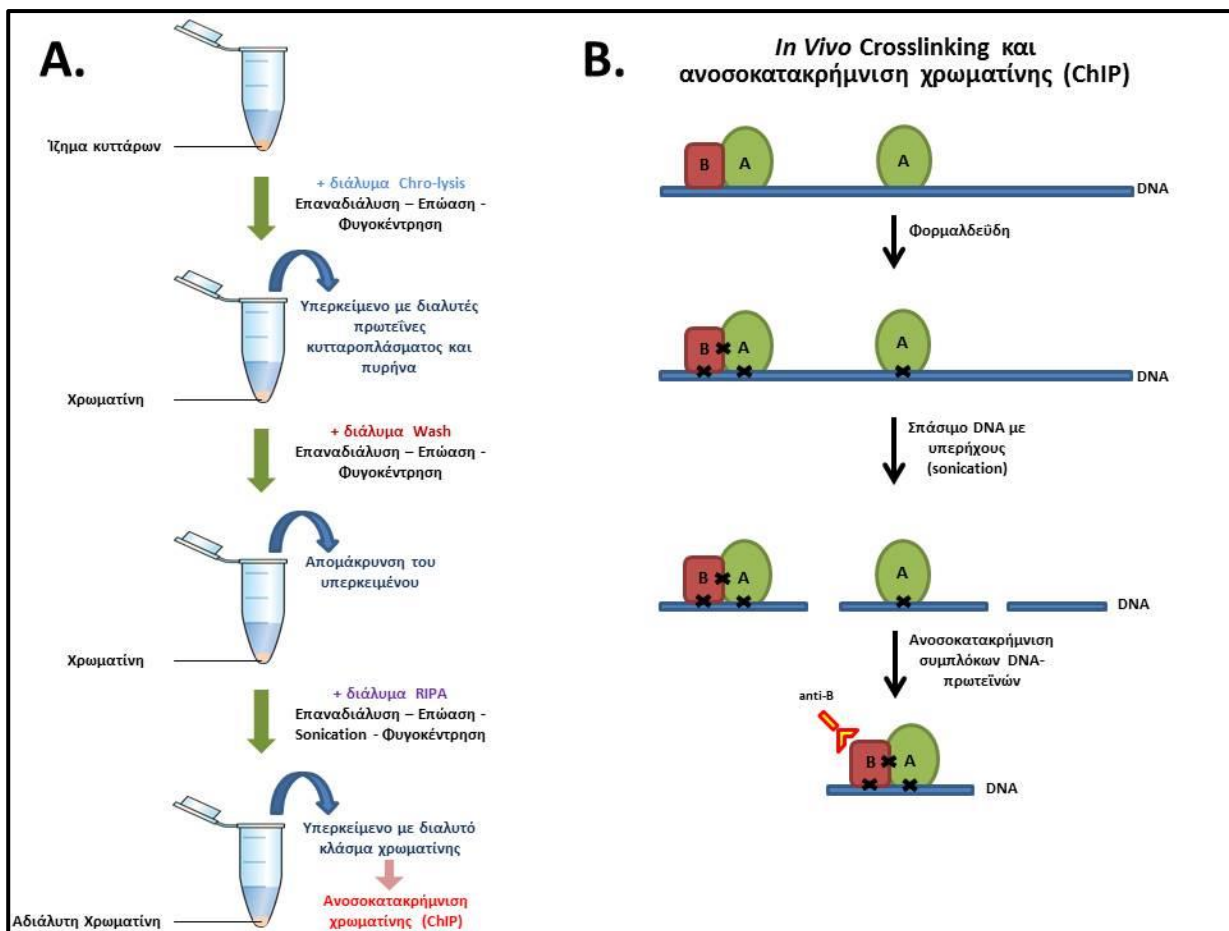
Την επόμενη μέρα τα σύμπλοκα αντισώματος-χρωματίνης συλλέχθηκαν με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων καλυμμένα με πρωτεΐνη A ή G (Dynabeads Protein A or G for Immunoprecipitation, Thermo Scientific). Η επώαση σφαιριδίων με σύμπλοκα αντισώματος-χρωματίνης πραγματοποιήθηκε στους 4°C, για 3 ώρες με περιστροφή (rotation). Στη συνέχεια τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν 2 φορές με 300 μl διάλυμα RIPA, 3 φορές με 300 μl διάλυμα RIPA που περιέχει 0.3M NaCl, μια φορά με 400 μl διάλυμα LiCl (10mM Tris-HCl PH 8.0, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.25M LiCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% Sodium Deoxycolate, 1mM PMSF, 10mM NaPy) και δύο φορές με 500 μl διαλύματος TE (10 mM Tris, 1mM EDTA). Στη συνέχεια έγινε έκλυση των ανοσοκατακρημνισμένων συμπλεγμάτων DNA-πρωτεϊνών σε διάλυμα 0.1M NaHCO₃, 1% SDS σε 2 κύκλους επώασης των 20 λεπτών στους 65°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και πραγματοποιήθηκε αντιστροφή της διασύνδεσης DNA-πρωτεϊνών (reverse crosslinking) για 16 ώρες, στους 65°C. Έπειτα, αφού πραγματοποιήθηκε επώαση με Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) 0.1 μg/μl για 1 ώρα στους 55°C, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA με τη βοήθεια των Agentcourt AMPURE XP beads (Beckman Coulter Life Sciences, Cat No. A63881) με βάση τις οδηγίες χρήσης του προϊόντος. Ακολούθως, το DNA χρησιμοποιήθηκε είτε για την κατασκευή βιβλιοθηκών συμβατών με αλληλούχιση νέας γενιάς, είτε για qPCR αντιδράσεις.

Στον παρακάτω πίνακα παραθέτονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή αυτή, για τα πειράματα ChIP-qPCR (βλέπε αντίστοιχα κεφάλαια αποτελεσμάτων).

Εκκινήτης	Αλληλουχία (5'-3')	Εφαρμογή σε τεχνική
SSBP1_F	GTGAGGGAGGAAGGGATAGC	ChIP-qPCR
SSBP1_R	AGGGCCAGACACCTACACAG	ChIP-qPCR
OSBPL9_F	ATTGGCGGCTCCCAAGAT	ChIP-qPCR
OSBPL9_R	GCATTGTAGTCCAGCACGAA	ChIP-qPCR
TRPM7_F	CCCAGGGAAACCTTCTCAG	ChIP-qPCR
TRPM7_R	TCGCACAATTATGAAAGACTCG	ChIP-qPCR
MYC_F	ACTCAGTCTGGGTGGAAGGTATC	ChIP-qPCR
MYC_R	GGAGGAATGATAGAGGCATAAGGAG	ChIP-qPCR
AKNA_F	CCGTTCCAATCCCTTACC	ChIP-qPCR
AKNA_R	TGGAACAAAGAATTCACAGG	ChIP-qPCR
APRT_F	GCCTTGACTCGCACTTTTGT	ChIP-qPCR
APRT_R	TAGGCGCCATCGATTTTAAG	ChIP-qPCR
HIF1A_F	CCCATCTCCTTTCTTTCTC	ChIP-qPCR
HIF1A_R	GGGTTCCCTCGAGATCCAATG	ChIP-qPCR
ChIA_neg_F	AGTCTGAGCTTTGTGGACAGC	ChIP-qPCR
ChIA_neg_R	CCCTCCAGTATACAGTCTTGC	ChIP-qPCR

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν σε ChIP-qPCR πειράματα.

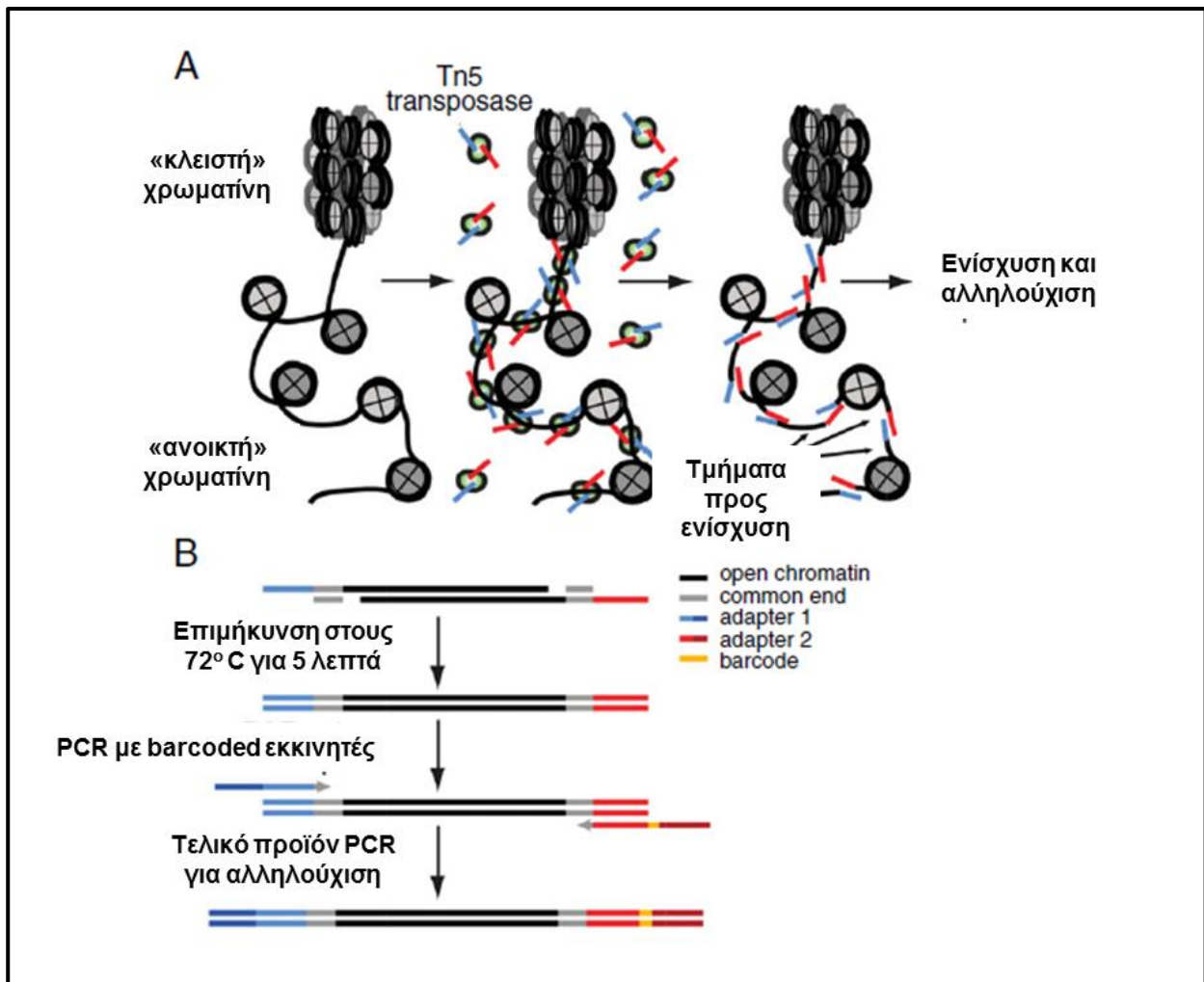
Στην εικόνα 13 απεικονίζονται σχηματικά οι βασικές αρχές των μεθόδων που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση χρωματίνης (A) αλλά και τη διασύνδεση DNA-πρωτεϊνών με φορμαλδεΰδη (*in vivo* crosslinking) (B).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν για (A) την απομόνωση χρωματίνης από κύτταρα αθανатоποιημένων ινοβλαστών και (B) για τη διασύνδεση DNA-πρωτεϊνών (*in vivo* crosslinking). Λεπτομέρειες σχετικές με την ακριβή σύσταση των διαλυμάτων αλλά και τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, βρίσκονται στις αντίστοιχες ενότητες της παρούσας διατριβής.

4.7 Δοκιμασία αλληλούχισης χρωματίνης προσβάσιμης από τρανσποζάση

Η δοκιμασία αλληλούχισης χρωματίνης προσβάσιμης από τρανσποζάση (Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση και μελέτη των περιοχών «ανοιχτής» χρωματίνης (Buenrostro et al. 2013, 2015). Η βασική αρχή της μεθόδου περιγράφεται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14. Μέθοδος ATAC-seq. (A) Η μέθοδος ATAC-seq βασίζεται στη δράση της υπερενεργούς τρανσποζάσης Tn5 στην οποία έχουν in vitro προσδεθεί ειδικοί προσαρμογείς (adapters), κατάλληλοι και συμβατοί με τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Η τρανσποζάση Tn5 μπορεί να κόβει και να ενσωματώνει τους ειδικούς προσαρμογείς σε περιοχές του γονιδιώματος όπου βρίσκεται προσβάσιμη χρωματίνη, όπως οι ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών και ενισχυτών. (B) Μετά την αντίδραση τρανσποζάσης, το DNA απομονώνεται και στη συνέχεια ενισχύεται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αρχική επιμήκυνση του DNA στους 72°C για 5 λεπτά, καθώς εξασφαλίζει τη συμπλήρωση των 3' άκρων των κομματιών DNA ώστε να είναι κατάλληλα για περαιτέρω ενίσχυση μέσω PCR. Για την PCR χρησιμοποιούνται barcoded εκκινητές (primers) κατάλληλοι για NGS. Τροποποίηση από Buenrostro et al. 2015.

Συγκεκριμένα, για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας διατριβής ακολουθήθηκε ένα βελτιωμένο πρωτόκολλο για τα ATAC-seq πειράματα, το οποίο μειώνει την επιμόλυνση από μιτοχονδριακό DNA και χαρακτηρίζεται από καλύτερη αναλογία σήματος / θόρυβο (Corces et al. 2017). Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Αφού μετρήθηκαν τα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα που περιείχε 50000 κύτταρα και ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 500 x g στους 4°C για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 50μl κρύο ATAC-Resuspension Buffer (10 mM TrisHCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂) το οποίο περιέχει 0.1% NP40, 0.1% Tween-20, και 0.01% Digitonin. Μετά την επαναδιάλυση το εναιώρημα επώαστηκε για 3 λεπτά στον πάγο.
- Στο εναιώρημα προστέθηκε 1ml κρύου ATAC-Resuspension Buffer που περιέχει 0.1% Tween-20 (αλλά όχι NP40 και Digitonin) και πραγματοποιήθηκε καλή ανάμιξη.
- Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 500 x g στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά.
- Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση τρανσποζάσης, όπου οι πυρήνες του ιζήματος επαναδιαλύθηκαν σε 50μl διάλυμα που περιέχει:
 - 25 μl TD (2× reaction buffer από Nextera DNA Library Preparation Kit, Cat No. FC-121-1030)
 - 2.5 μl TDE1 (Nextera Tn5 τρανσποζάση από Nextera DNA Library Preparation Kit)
 - 16.5 μl 1x PBS
 - 0.5 μl 1% digitonin
 - 0.5 μl 10% Tween-20
 - 5 ul H₂O
 Στη συνέχεια το μίγμα επώαστηκε για 30 λεπτά, σε υδατόλουτρο των 37°C.
- Αμέσως γίνεται απομόνωση και καθαρισμός του DNA χρησιμοποιώντας το Qiagen MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Cat No. 28004)
- Το DNA συλλέχθηκε σε 10μl και φυλάχθηκε στους -20°C.

Για να γίνει ενίσχυση των κομματιών DNA που απομονώθηκαν μετά την αντίδραση τρανσποζάσης και τη δημιουργία NGS βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη PCR (σε τελικό όγκο 50μl):

10 μl DNA απομονωμένο μετά την αντίδραση τρανσποζάσης

10 μl H₂O

2.5 μl 25 μM PCR Primer 1

2.5 μl 25 μM Barcoded PCR Primer 2

25 μl NEBNext High-Fidelity 2× PCR Master Mix (NEB, Cat No. M0541S)

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Διάρκεια
1	72°C	5 min
	98°C	30 sec
5	98°C	10 sec
	63°C	30 sec
	72°C	1min

Για να προσδιοριστεί ο ακριβής αριθμός κύκλων που απαιτείται ώστε η ενίσχυση των βιβλιοθηκών να φτάσει σε σημείο κορεσμού (saturation), 5μl από την παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση qPCR η οποία πραγματοποιείται στις παρακάτω συνθήκες:

5 μl από το DNA της προηγούμενης PCR

4.41μl H₂O

0.25 μl 25 μM PCR Primer 1

0.25 μl 25 μM Barcoded PCR Primer 2

0.09 μl 100× SYBR Green I

5 μl NEBNext High-Fidelity 2× PCR Master Mix

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Διάρκεια
1	98°C	30 sec
20	98°C	10 sec
	63 °C	30 sec
	73 °C	1 min

Μετά τον ακριβή προσδιορισμό των επιπλέον κύκλων (N) ενίσχυσης τα υπόλοιπα 45μl της αρχικής αντίδρασης συνέχισαν να υπόκεινται σε ενίσχυση μέσω PCR ως εξής:

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Διάρκεια
1	98°C	30 sec
N	98°C	10 sec
	63°C	30 sec
	72°C	1 min

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και απομόνωση των ενισχυμένων βιβλιοθηκών με τη χρήση του Qiagen MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Cat No. 28004) και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

4.8 Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και στύψωμα Western

Στο πρωτεϊνικό υλικό προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος 2x loading dye (100 mM Tris PH 6.8, 4% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 20%(v/v) γλυκερόλη, 200mM DTT). Στη συνέχεια τα δείγματα που έχουν υποστεί διασύνδεση, επώαστηκαν στους 95°C για 45 λεπτά, ενώ τα δείγματα που δεν έχουν υποστεί διασύνδεση, στην ίδια θερμοκρασία για 15 λεπτά.

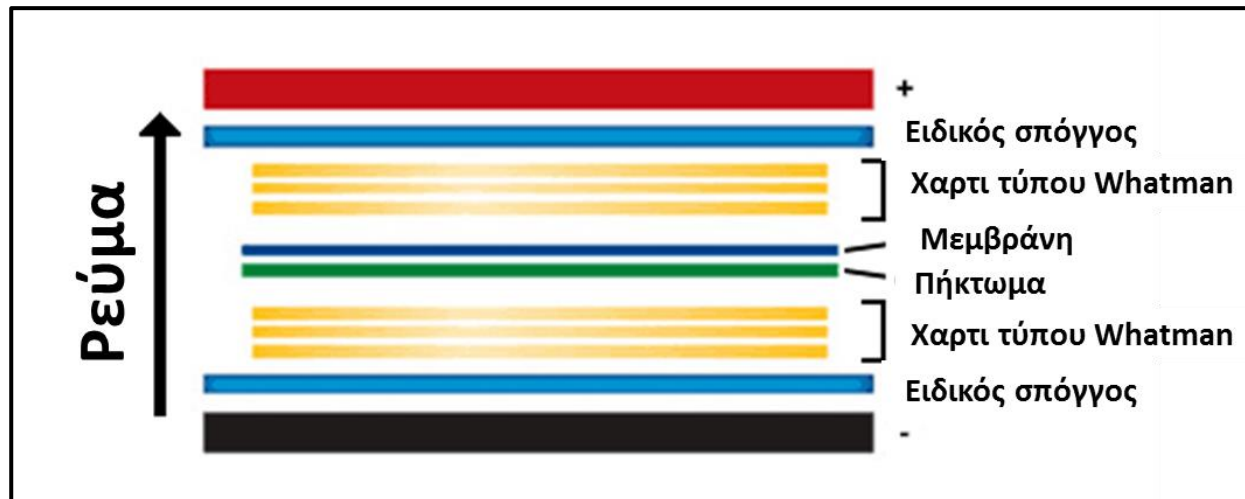
Για την ηλεκτροφόρηση και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε δείγματα Inputs ή δείγματα CHIP χρησιμοποιήθηκαν προκατασκευασμένα πηκτώματα διαβαθμισμένης πυκνότητας (gradient gel, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels, Thermo Fischer, Cat. No NP0321BOX), με σκοπό τόσο οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους όσο και αυτές μικρότερου, να διαχωριστούν στο ίδιο πήκτωμα, για να μπορούν να μελετηθούν ταυτόχρονα. Ίση ποσότητα δειγμάτων «φορτώθηκε» στα πηγαδάκια καθώς και ποσότητα 5μl δείγματος δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Dual Colour Standards, BIORAD, Cat No. 1610394). Στη συσκευή προστέθηκε 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (χρησιμοποιώντας κατάλληλη αραιώση σε H₂O του 20x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer, Cat No. NP001) και στη συνέχεια εφαρμόστηκε τάση 130V για περίπου 1ώρα και 30 λεπτά.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων των ιστών χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα ακρυλαμίδης το οποίο αποτελείται από δύο επιμέρους τμήματα: πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) και πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το stacking gel συντελεί στη συγκέντρωση και ομοιόμορφη είσοδο του πρωτεϊνικού υλικού στο separating gel, όπου στη συνέχεια πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Συγκεκριμένα, λόγω του μικρού μοριακού βάρους των ιστών χρησιμοποιήθηκε separating gel με 12% περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα. Αναλυτικότερα τα stacking και separating gel παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

	10ml stacking gel (5%)	10ml separating gel (12%)
H ₂ O	7.225ml	4.3ml
40% ακρυλαμίδη	1.275ml	3ml
1M Tris (PH 6.8)	1.25	-
1.5M Tris (PH 8.8)	-	2.5ml
10% SDS	0.1ml	0.1ml
10% APS (Ammonium persulfate)	0.1ml	0.1ml
TEMED	0.01ml	0.004ml

Πίνακας 5. Σύσταση των επιμέρους πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση ιστονικών πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε η ηλεκτρο-μεταφορά (transfer) του πρωτεϊνικού υλικού από το πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF (Millipore, Cat No. IPFL00010). Η ηλεκτρο-μεταφορά πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικής συσκευής, η διάταξη της οποίας φαίνεται στην εικόνα 15.



Εικόνα 15. Διάταξη της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς (transfer) του πρωτεϊνικού υλικού από το πήκτωμα ακρυλαμίδης στη μεμβράνη (τροποποίηση από www.abcam.com/protocols)

Για τις ανάγκες της ηλεκτρο-μεταφοράς η συσκευή συμπληρώθηκε με κατάλληλο διάλυμα (1x Transfer Buffer), του οποίου η σύσταση εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών: Για πρωτεΐνες μεγαλύτερες των 120 kDa χρησιμοποιήθηκε το SDS Transfer Buffer, ενώ για πρωτεΐνες μικρότερες των 120 kDa χρησιμοποιήθηκε το Methanol Transfer Buffer. Η σύσταση των δύο αυτών διαλυμάτων περιγράφεται στον πίνακα 6. Η ηλεκτρο-μεταφορά πραγματοποιήθηκε στους 4°C overnight. Η τάση που

εφαρμόστηκε ήταν 28V για πρωτεΐνες μεγαλύτερες από 25kDa ενώ 18V εφαρμόστηκαν για πρωτεΐνες μικρότερες του μοριακού βάρους των 25kDa.

	SDS Transfer Buffer	Methanol Transfer Buffer
10x Running Buffer	100ml	100 ml
ddH₂O	899ml	700ml
SDS 10%	1ml	-
Methanol	-	200ml

Πίνακας 6. Σύσταση των διαλυμάτων Transfer Buffer που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. [Σημειώνεται πως το 10x Running Buffer έχει σύσταση 0.25M Tris Base(Fischer Scientific Cat No. BP152-1), 1.92M Glycine (Fischer Scientific BP381-5)]

Μετά το πέρας της ηλεκτρο-μεταφοράς οι μεμβράνες επώαστηκαν για 8 ώρες στους 4°C σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (Blocking Buffer), το οποίο αποτελείται από PBS 1x: Licor (Odyssey Blocking Buffer, Cat No. 927-40000) σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες επώαστηκαν με το επιθυμητό πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο βρίσκεται αραιωμένο σε διάλυμα PBS 1x: Licor: 0.1% Tween 20. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 4°C για 16 ώρες.

Ακολούθως, απομακρύνεται το πρωτογενές αντίσωμα και οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 4 φορές με PBS 1x:Tween 20 0.1%, με 5 λεπτά επώασης για κάθε πλύση, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση με το επιθυμητό δευτερογενές αντίσωμα (IRDye Secondary Antibodies, LICOR), το οποίο προστέθηκε σε αραιώση 1:10000, για 45-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 4 πλύσεις με PBS 1x:Tween 20 0.1% και μία πλύση με PBS 1x και εν συνεχεία οι μεμβράνες μεταφέρθηκαν σε ειδικό μηχάνημα απεικόνισης (Odyssey CLX Imaging System), όπου και πραγματοποιείται οπτικοποίηση του ανοσοστυπώματος.

4.9 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό μορίων DNA, με βάση το μοριακό τους βάρος. Κατά την ηλεκτροφόρηση, κομμάτια DNA (αρνητικά φορτισμένα) κινούνται προς τον θετικό πόλο διαμέσου των πόρων της αγαρόζης και έτσι πραγματοποιείται διαχωρισμός, καθώς όσο μικρότερου μοριακού βάρους είναι ένα κομμάτι DNA τόσο γρηγορότερα θα κινηθεί.

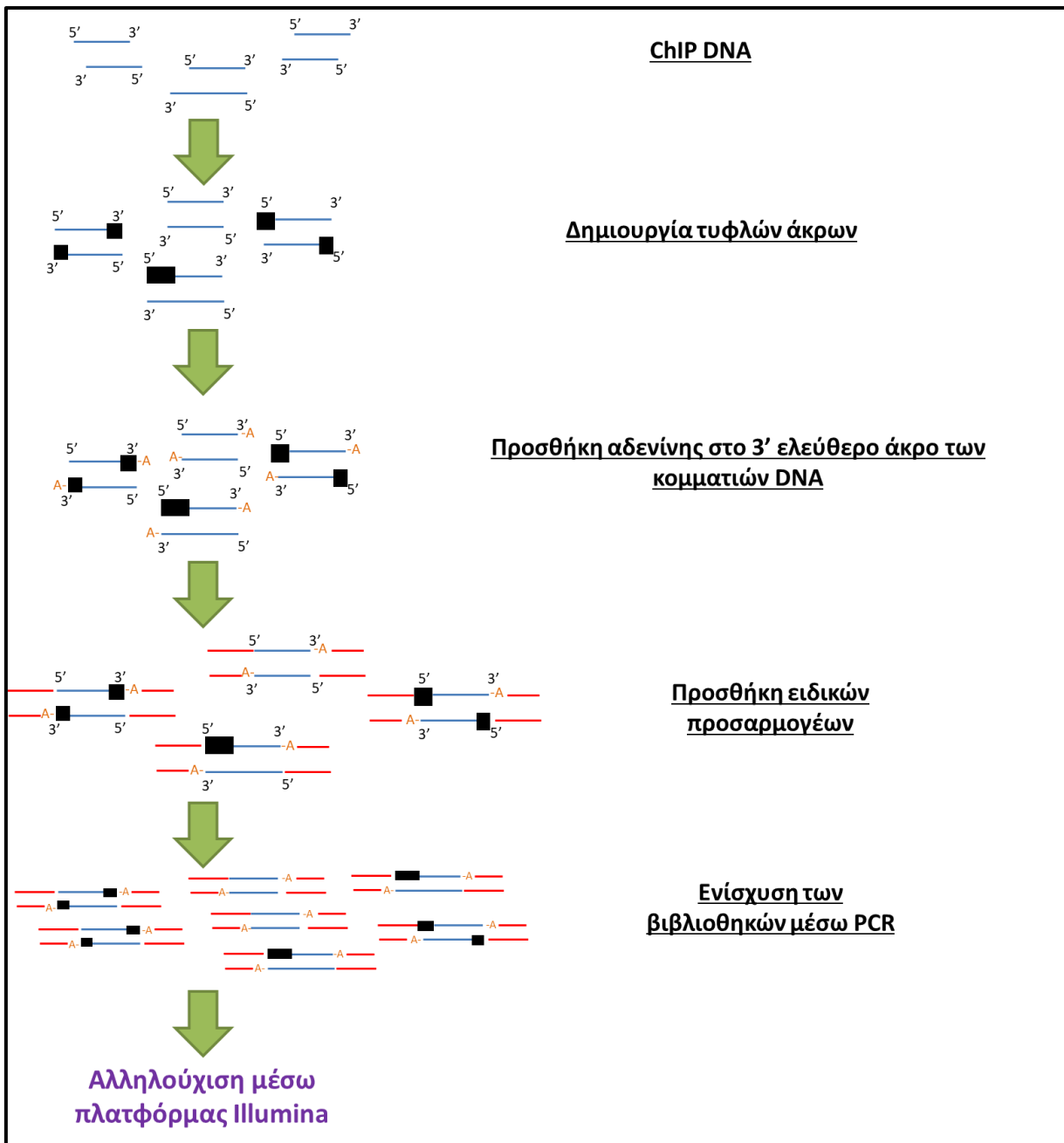
Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Διάλυμα TAE 50x (242 g Tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 100 ml 0.5M EDTA pH 8.0) αραιώνεται κατάλληλα με ddH₂O για την παρασκευή διαλύματος TAE 1x.

- Ποσότητα (0.5g - 1g) αγαρόζης (Fischer Scientific, Cat No. BP160-500) ζυγίζεται και στη συνέχεια η σκόνη προστίθεται σε διάλυμα TAE 1X. Η πυκνότητα του ηλεκτώματος εξαρτάται από τις ανάγκες του πειράματος. Συνήθως χρησιμοποιείται πήκτωμα 1% (0.5g αγαρόζης σε 50ml TAE 1x) ωστόσο, για μικρότερα κομμάτια DNA χρησιμοποιούνται κατά κανόνα πιο πυκνά ηλεκτώματα αγαρόζης (2%).
- Το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων όπου και θερμαίνεται για 2-3 λεπτά.
- Στη συνέχεια, αφού ελαττωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος, προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml και αναδεύεται καλά. Το βρωμιούχο εθίδιο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA) και κατόπιν να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Με τον τρόπο αυτό οπτικοποιούνται τα νουκλεϊνικά οξέα κατά την ηλεκτροφόρηση.
- Αφού ελαττωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος, αυτό μεταφέρεται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχουν τοποθετηθεί ειδικά «χτενάκια» με σκοπό τη δημιουργία «πηγαδιών» στο πήκτωμα. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου πήξει.
- Αφού πήξει, το πήκτωμα καλύπτεται από διάλυμα TAE 1x
- Τα δείγματα DNA προετοιμάζονται αραιώνοντας κατάλληλη ποσότητα από το 6x loading dye στα δείγματα σε τελική αραιώση 1x.
- Τα δείγματα «φορτώνονται» στα ειδικά «πηγάδια» του ηλεκτώματος και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για κατάλληλο χρονικό διάστημα στα 120V.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική συσκευή απεικόνισης (UVP, GelDoc-It^e Imaging System), όπου και πραγματοποιείται οπτικοποίηση του σήματος DNA έπειτα από έκθεση σε υπεριώδες φως.

4.10 Κατασκευή βιβλιοθηκών συμβατές με αλληλούχιση νέας γενιάς

Η κατασκευή βιβλιοθηκών από κομμάτια CHIP DNA είναι μια διαδικασία που απαιτείται για να είναι τα δείγματα συμβατά με τις πλατφόρμες αλληλούχισης. Ακόμα, μέσω αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται το multiplexing των δειγμάτων, η δυνατότητα δηλαδή να αλληλουχηθούν περισσότερο από ένα δείγματα σε μία αντίδραση αλληλούχισης. Παρακάτω παραθέτονται τα διάφορα στάδια της κατασκευής βιβλιοθηκών (σχηματική απεικόνιση στην εικόνα 16) από δείγματα CHIP DNA.



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων της κατασκευής βιβλιοθηκών από δείγματα ChIP DNA

4.10.1 Δημιουργία «τυφλών» άκρων:

Η ποσότητα του ChIP (ή Input) DNA που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των βιβλιοθηκών ήταν 3-10ng. Τα κομμάτια ChIP DNA υπέστησαν δημιουργία τυφλών άκρων όπως περιγράφεται παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Όγκος
ChIP ή Input DNA (3-10ng)	Έως 14μl
10x T4 DNA ligase buffer (NEB, Cat No. B0202S)	2.5μl
dNTPs (10mM) (Thermo Fischer, Cat No. 10297018)	1μl
End Repair (ER) enzyme mix	0.5μl
H2O	Έως τελικό όγκο 25μl

Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιείται για 30 λεπτά στους 20°C.

Σημειώνεται πως για το ER mix χρησιμοποιούνται τα εξής:

Αντιδραστήριο	Όγκος
T4 DNA polymerase (3U/μl) (NEB, Cat No. M0203L)	30μl
Klenow fragment (5U/μl) (NEB, Cat No. M0210L)	6μl
T4 DNA PNK (10U/μl) (NEB, Cat No. 0201L)	30μl

Μετά το πέρας της αντίδρασης το DNA απομονώνεται με τη χρήση Agentcourt AMPURE XP beads σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Ο τελικός όγκος επαναδιάλυσης του είναι 16.5 μl.

4.10.2 Προσθήκη αδερίνης στο 3' ελεύθερο άκρο:

Μετά τη δημιουργία τυφλών άκρων στα κομμάτια του DNA, πραγματοποιείται προσθήκη αδερίνης στο 3' άκρο των κομματιών. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής:

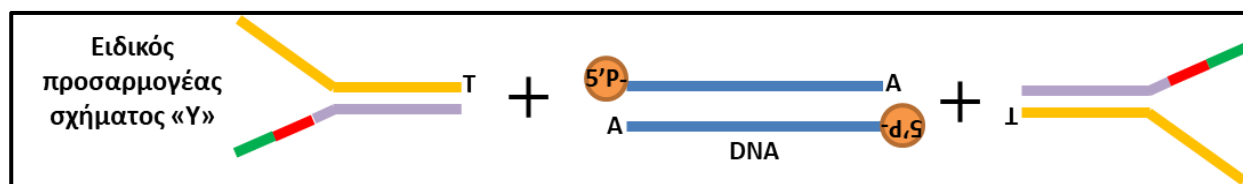
Αντιδραστήριο	Όγκος
DNA	16.5μl
10x NEB Buffer 2 (NEB, Cat No. B7002S)	2μl
dATP (10mM)	1μl
Klenow fragment 3'→5' exo- (NEB, Cat No. M0212S)	0.5μl

Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιείται στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται καθαρισμός του DNA με τη χρήση Agentcourt AMPURE XP beads και επαναδιάλυση σε τελικό όγκο 12μl.

4.10.3 Προσθήκη ειδικών προσαρμογέων

Στην συνέχεια, στα δείγματα προστίθενται ειδικοί προσαρμογείς, οι οποίοι περιέχουν αλληλουχίες-δείκτες (indexes) που επιτρέπουν την ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Σημειώνεται ότι οι ειδικοί προσαρμογείς (adapters) της Illumina έχουν σχήμα «Y» (αποτελούμενοι από

δύο μερικώς συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια, βλέπε εικόνα 17) και διαθέτουν ελεύθερη θυμίνη (T) στο 3' άκρο τους, η οποία θα συνδυαστεί συμπληρωματικά με την αδενίνη (A) που ήδη βρίσκεται (από το προηγούμενο βήμα) στα τμήματα του DNA (βλέπε Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Προσθήκη ειδικών προσαρμογέων Illumina σε τμήματα DNA που έχουν ανοσοκατακρημνισθεί. Κάθε ειδικός προσαρμογέας (adapter) αποτελείται από δύο ολιγονουκλεοτίδια μερικώς συμπληρωματικά εκ των οποίων το ένα (κίτρινο στην Εικόνα 17) είναι κοινό για όλους τους προσαρμογείς και διαθέτει ελεύθερη θυμίνη (T) στο 3' άκρο του. Το άλλο ολιγονουκλεοτίδιο διαθέτει την αλληλουχία-δείκτη (index, κόκκινο στην εικόνα) που αποτελεί «ταυτότητα» του κάθε δείγματος και επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών δειγμάτων.

Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο βήματα ως εξής:

Στο πρώτο βήμα, το DNA προεπώαζεται με ποσότητα των adapters για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετά από καλή ανάμιξη, όπως φαίνεται παρακάτω.

DNA	12μl
Illumina adapter (0.25μM)	1μl

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η εξής αντίδραση:

DNA + adapters (από προηγούμενο βήμα)	13μl
5x Quick Ligase Buffer (NEB, B6058S)	6μl
H2O	10μl
Quick Ligase (NEB, M2200L)	1μl

Η αντίδραση επώαζεται για 20 λεπτά στους 25°C και μετά το τέλος της, προστίθενται στο μίγμα 3 μl H₂O.

4.10.4 Απομόνωση DNA επιλογή μεγεθών 150bp-500bp

Μετά την προσθήκη των ειδικών προσαρμογέων το δείγμα υφίσταται διπλή διαδοχική απομόνωση με τη βοήθεια Agentcourt AMPURE XP beads με σκοπό 1) την απομάκρυνση DNA μικρότερου των 150 βάσεων (απομακρύνοντας έτσι τυχόν διμερή προσαρμογέων που έχουν πιθανώς σχηματιστεί) και 2) την απομάκρυνση DNA μεγαλύτερο των 500bp, το οποίο δεν είναι κατάλληλο για NGS. Η διαδικασία αυτή της απομόνωσης έχει ως εξής:

- 1^η απομόνωση (απομάκρυνση DNA μικρότερου από 150bp)

AMPURE XP beads	16,5μl
PEG 8000 (Promega, V3011) 1.25M NaCl	14,85μl
Sample	33μl

Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια απομόνωση με βάση τις οδηγίες των Agentcourt AMPURE XP beads. Το δείγμα επαναδιαλύεται σε τελικό όγκο 20μl.

- 2^η απομόνωση (απομάκρυνση DNA μεγαλύτερου από 500bp)

AMPURE XP beads	12μl
Sample	20μl

Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και υπόκειται σε νέα απομόνωση ως εξής:

AMPURE XP beads	32μl
Sample	16μl

Ακολουθεί απομόνωση με βάση τις οδηγίες των Agentcourt AMPURE XP beads. Ο τελικός όγκος επαναδιάλυσης του δείγματος είναι 12μl.

4.10.5 Ενίσχυση βιβλιοθηκών μέσω PCR

Στη συνέχεια, η βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε ενισχύεται ώστε το υλικό να είναι ποσοτικά επαρκές για αλληλούχιση. Οι αλληλουχίες των προσαρμογών (adapters) που προσθέτονται στα δείγματα (βλέπε παραπάνω), επιτρέπουν την ενίσχυση όλων των διαφορετικών δειγμάτων, χρησιμοποιώντας το ίδιο ζεύγος εκκινήτων. Ιδιαίτερα σημαντικό στη διαδικασία αυτή είναι η αναγκαιότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR με σκοπό αυτή να σταματήσει λίγο πριν τη φάση κορεσμού (plateau) της αντίδρασης, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί το φαινόμενο της παρουσίας διπλών αλληλουχιών λόγω κατασκευής της βιβλιοθήκης (read duplication). Για τον σκοπό αυτό, μέρος του υλικού (των 12μl που έχει τους προσαρμογείς και έχει το επιθυμητό μέγεθος, βλέπε παραπάνω) χρησιμοποιείται σε αντίδραση qPCR ώστε να καθοριστεί ο ακριβής αριθμός κύκλων ενίσχυσης που θα πρέπει να υποστεί το υλικό.

Αρχικά πραγματοποιείται η εξής qPCR αντίδραση:

TruSeq PCR primer cocktail (5μM ο κάθε primer)	1μl
2X SYBR Kapa HiFi HotStart Ready Mix (KAPA BIOSYSTEMS, KK4601)	7.5μl
H ₂ O	5.5μl
DNA (επιθυμητού μεγέθους με ενωμένους adapters)	1μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

Κυκλοι	Θερμοκρασία	Διάρκεια	
1	98°C	45sec	Αρχική αποδιάταξη
	98°C	15sec	Αποδιάταξη
22	63°C	30sec	Προσαρμογή εκκινητών
	72°C	30sec	Επιμήκυνση

Με βάση τους κύκλους που απαιτήθηκαν για να φθάσει η παραπάνω αντίδραση σε κορεσμό (plateau), προετοιμάζεται η τελική αντίδραση ενίσχυσης των βιβλιοθηκών, όπου σχεδόν το σύνολο του υλικού ενισχύεται. Η αντίδραση προετοιμάζεται ως εξής:

TruSeq PCR primer cocktail (5μM ο κάθε primer)	1μl
2X Kapa HiFi HotStart Ready Mix (KAPA BIOSYSTEMS, KK2601)	10μl
H ₂ O	1μl
DNA (επιθυμητού μεγέθους με ενωμένους adapters)	8μl

Οι συνθήκες αντίδρασης είναι οι ακόλουθες (όπου N ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, όπως αυτός υπολογίστηκε από την παραπάνω αντίδραση qPCR):

Κυκλοι	Θερμοκρασία	Διάρκεια	
1	98°C	45sec	Αρχική αποδιάταξη
	98°C	15sec	Αποδιάταξη
N	63°C	30sec	Προσαρμογή εκκινητών
	72°C	30sec	Επιμήκυνση
1	72°C	60sec	Τελική επιμήκυνση

Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί καθαρισμός και απομόνωση του DNA με τη βοήθεια των Agentcourt AMPURE XP beads.

4.11 Ανάλυση και Υπολογισμός του Δείκτη Διαφυγής από τον Υποκινητή

Ο υπολογισμός του δείκτη διαφυγής από τον υποκινητή (Promoter Escape Index, EI) πραγματοποιήθηκε για μια υποομάδα των ενεργών υποκινητών διπλής κατεύθυνσης, υποκινητών μονής κατεύθυνσης, PROMPTs και ενισχυτών. Για να μην συμπεριληφθούν reads που θα αντιστοιχούσαν σε περιοχές αλληλοεπικαλυπτόμενων υποκινητών και γονιδίων, η ανάλυση εστιάστηκε στα ζευγάρια μη επικαλυπτόμενης μεταγραφής (divergent pairs) ενεργών υποκινητών διπλής κατεύθυνσης και ενεργών υποκινητών μονής κατεύθυνσης-PROMPTs, για τα οποία η απόσταση των αντίστοιχων TSSs (απόσταση μεταξύ των συντεταγμένων των TSS στον + και - κλώνο του DNA) είναι μεγαλύτερη των 100 bp ($TSS_{distance} > 100$ bp). Τέλος, για τους ενεργούς διαγονιδιακούς ενισχυτές, στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν εκείνοι οι οποίοι απέχουν α) γονιδιωματική απόσταση μεγαλύτερη των 10 kb από το πλησιέστερο γονίδιο και β) γονιδιωματική απόσταση μεγαλύτερη των 2 kb από το κοντινότερο eTSS.

Για τα TSS και τα ζεύγη PROMPT-TSS ο δείκτης EI υπολογίστηκε όπως στο Lavigne et al. 2017 και ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των reads που βρίσκονταν στο εσωτερικό του γονιδίου (Density in gene body (Db), γονιδιωματικές περιοχές από 101 bp έως 2 kb καθοδικά του TSS για γονίδια μεγαλύτερα των 2 kb ή έως του TTS για γονίδια μικρότερα των 2 kb) προς τον αριθμό των reads που βρίσκεται στις περιοχές του υποκινητή (Density in promoter proximal region (Dp), γονιδιωματικές περιοχές που ορίζονται ως 250 bp ανοδικά και 100 bp καθοδικά του TSS). Με αντίστοιχο τρόπο υπολογίστηκε ο EI στους ενισχυτές, όπου υπολογίστηκε ο λόγος του αριθμού των reads στις περιοχές παραπλεύρως του eTSS (Enhancer Flanks (Df), γονιδιωματικές περιοχές από 2 kb έως 100 bp ανοδικά του eTSS και περιοχές από 100 bp έως 2 kb καθοδικά του eTSS) προς τον αριθμό των reads στις περιοχές του κέντρου του ενισχυτή (γονιδιωματικές περιοχές 100 bp εκατέρωθεν του eTSS).

4.12 Λειτουργική ταξινόμηση γονιδίων και ενισχυτών σε Vh10 κύτταρα

Τα γονίδια κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες, ανάλογα με την μεταγραφική τους ενεργότητα. Για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής ενεργότητας, οι συντεταγμένες των TSS των γονιδίων επεκτάθηκαν για 2 kb προς κάθε κατεύθυνση (περιοχή υποκινητή) και ελέγχθηκε η αλληλεπικάλυψη των γονιδιωματικών αυτών περιοχών με τουλάχιστον μια ChIP-seq κορυφή (peak) από Pol II-ser2P, H3K27ac και H3K27me3, από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα (NO UV). Τα γονίδια στα οποία βρέθηκε τουλάχιστον ένα peak από ChIP-seq πειράματα των Pol II-ser2P και H3K27ac,

χαρακτηρίστηκαν ως ενεργά γονίδια. Τα γονίδια στα οποία εντοπίστηκε peak από ChIP-seq H3K27me3 αλλά όχι peaks από Pol II-ser2P και H3K27ac ChIP-seq, χαρακτηρίστηκαν ως κατεσταλμένα. Γονίδια στα οποία δεν εντοπίστηκε κανένα από τα παραπάνω ChIP-seq peaks χαρακτηρίστηκαν ως ανενεργά, ενώ γονίδια στα οποία εντοπίστηκαν συγχρόνως ChIP-seq peaks από H3K27ac και H3K27me3, εξαιρέθηκαν από τη συνέχεια της ανάλυσης. Η ανωτέρω ομαδοποίηση οδήγησε στον εντοπισμό και χαρακτηρισμό 15.819 ενεργών, 2.943 κατεσταλμένων και 7.608 ανενεργών γονιδίων.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την κατεύθυνση της μεταγραφής, τα ενεργά TSS ταξινομήθηκαν περαιτέρω σε TSS διπλής κατεύθυνσης (bidirectional) και TSS μονής κατεύθυνσης (unidirectional). Όλα τα ζεύγη ενεργών TSS όπου για την απόσταση των TSS (TSSdistance, απόσταση μεταξύ των συντεταγμένων των TSS στον + και - κλώνο του DNA) ίσχυε $-2 \text{ kb} \leq \text{TSSdistance} \leq +2 \text{ kb}$, χαρακτηρίστηκαν ως TSS διπλής κατεύθυνσης (υποκινητές διπλής κατεύθυνσης), ενώ τα υπόλοιπα χαρακτηρίστηκαν ως TSS μονής κατεύθυνσης (υποκινητές μονής κατεύθυνσης). Ακόμη, τα TSS διπλής κατεύθυνσης διαχωρίστηκαν σε ζευγάρια επικαλυπτόμενης (convergent, TSSdistance $\leq 100 \text{ bp}$) και μη επικαλυπτόμενης (divergent, TSSdistance $> 100 \text{ bp}$) μεταγραφής. Η ανωτέρω ταξινόμηση οδήγησε στον χαρακτηρισμό 12.859 ενεργών μεταγράφων μονής κατεύθυνσης και 2.822 ενεργών μεταγράφων διπλής κατεύθυνσης, εκ των οποίων τα 1.806 χαρακτηρίζονται από μη επικαλυπτόμενη, ενώ τα 1.016 από επικαλυπτόμενη, μεταγραφή.

Για να συμπεριληφθεί στην ανάλυση η αντινοσηματική μη κωδική μεταγραφή που λαμβάνει χώρα γύρω από τα TSS των mRNAs, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των αντινοσηματικών μεταγράφων (PROMPTs), που βρίσκονται τόσο ανοδικά όσο και καθοδικά σε σχέση με τα ενεργά TSS μονής κατεύθυνσης. Για τον σκοπό αυτό, το αντινοσηματικό CAGE peak με την υψηλότερη κορυφή σε μια περιοχή από -2 kb έως +1 kb από κάθε ενεργό TSS μονής κατεύθυνσης, θεωρήθηκε ως το PROMPT TSS. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και για τα ανενεργά γονίδια για να καθοριστεί η υψηλότερη μη ειδική κορυφή CAGE peak και στη συνέχεια μόνο τα peaks υψηλότερα από τη μέση μη ειδική CAGE κορυφή θεωρήθηκαν ενεργά PROMPTs για περαιτέρω ανάλυση. Η παραπάνω ανάλυση οδήγησε σε 5.366 ζευγάρια ενεργών γονιδίων μονής κατεύθυνσης-PROMPTs, από τα οποία τα 1.444 χαρακτηρίζονται από μη επικαλυπτόμενη μεταγραφή, ενώ τα 3.922 ζευγάρια από επικαλυπτόμενη μεταγραφή (βλέπε παραπάνω).

Για την λειτουργική ταξινόμηση των ενισχυτών χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι 65.423 ανθρώπινοι ενισχυτές από τις φάσεις 1 και 2 του FANTOM5 project (http://fantom.gsc.riken.jp/5/datafiles/phase2.2/extra/Enhancers/human_permissive_enhancers_phase_1_and_2.bed.gz), ενώ ως eTSS θεωρήθηκε το κέντρο των αντίστοιχων γονιδιωματικών συντεταγμένων. Οι ενισχυτές διαχωρίστηκαν στη συνέχεια σε 6.766 ενεργούς, 4.730 κατεσταλμένους και 39.227 ανενεργούς, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ειδικά για την ανάλυση του EI, μόνο οι ενεργοί

διαγονιδιακοί ενισχυτές χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση, ενώ εξαιρέθηκαν όλοι εκείνοι οι ενεργοί διαγονιδιακοί ενισχυτές που απέχουν ίσο ή λιγότερο των 10 kb από το κοντινότερο γονίδιο και ίσο ή λιγότερο των 2 kb από το κοντινότερο eTSS. Στη συνέχεια, σε ακτίνα 1 kb από τα eTSS των διαγονιδιακών ενισχυτών, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του υψηλότερου CAGE peak τόσο σε + όσο και σε - κατεύθυνση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και για τους ανενεργούς ενισχυτές για να καθοριστεί η υψηλότερη μη ειδική κορυφή CAGE peak και στη συνέχεια, μόνο οι ενισχυτές για τους οποίους τα CAGE peaks ήταν υψηλότερα από τη μέσο μη ειδικό CAGE peak, θεωρήθηκαν ενεργοί διαγονιδιακοί ενισχυτές για περαιτέρω ανάλυση. Η ανωτέρω διαδικασία οδήγησε στην επιλογή 1.228 ενεργών διαγονιδιακών ενισχυτών και eTSSs.

4.13 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα ινοβλαστών έγινε με την χρήση τριζόλης (TRIzol reagent, Thermo Fischer, Cat. No. 15596018) σε καλλιέργειες κυττάρων πλήρους ταπητίου. Συγκεκριμένα αφού το θρεπτικό υλικό των κυττάρων απομακρύνθηκε και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με παγωμένο PBS 1x, προστέθηκαν 800μl TRIzol (για πιάτα καλλιέργειας επιφάνειας 58 cm²) και στη συνέχεια συλλέχθηκε το κυτταρικό υλικό σε ειδικά σωληνάρια τύπου erpendorf. Τα δείγματα αφέθηκαν στον πάγο για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια σε αυτά προστέθηκαν 160 μl χλωροφόρμιο. Αφού αναδεύτηκαν έντονα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 16000 rpm. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης συλλέχθηκε (όγκος = V) και σε αυτό πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση μέσω αιθανόλης ως εξής: στο δείγμα προστίθεται 1/10 V NaAc (3 M, Thermo Fischer, Cat. No. AM9740), 2.5 V 100% αιθανόλη και 1 μl γλυκογόνο (Glycogen 5 mg/ml, Thermo Fischer, Cat. No. AM9510). Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν στους -80 °C για 16 ώρες. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά, στις 16000 rpm, στους 4 °C και το μικρό ίζημα που σχηματίστηκε, ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Ύστερα, πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στις 16000 rpm, στους 4 °C και αφού απομακρύνθηκε η αιθανόλη, τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε υπερκάθαρο νερό, και μετρήθηκε η συγκέντρωσή τους. Για να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις DNA που πιθανόν να εμπεριέχονται στο δείγμα, πραγματοποιήθηκαν ενζυματικές αντιδράσεις DNάσης ως εξής: για 10 μg RNA χρησιμοποιήθηκαν 2,5 μl Turbo DNase (Thermo Fischer, Cat. No. AM2238) και κατάλληλη ποσότητα 10x Turbo DNase Buffer. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37 °C. Στη συνέχεια, στα δείγματα προστέθηκε ίδιος όγκος διαλύτη φαινόλης, χλωροφορμίου ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 και μετά από έντονη ανάδευση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 14000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης προστέθηκε ίδιος όγκος διαλύτη χλωροφορμίου ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 14000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση αιθανόλης,

όπως περιγράφεται παραπάνω. Για τις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fischer, Cat. No.18064014), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των διάφορων γονιδίων πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις qPCR. Για τον σκοπό αυτό, στα πλαίσια της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: HOXB9_F: 5'-AGGCCGTGCTGTCTAATCAAA-3', HOXB9_R: 5'-CGAGCGTGCAGCCAGTT-3', HOXB7_F: 5'-CCTTTGAGCAGAACCTCTCC-3', HOXB7_R: 5'-GTCTTCCGTGAGGCAGAG-3', HOXB4_F: 5'-CGTCTACCCCTGGATGCGCAA-3' , HOXB4_R: 5'-GGCGATCTCCACCCTCCGGC-3', HOXD8_F: 5'- GAGGACCCAGACCACTTAAATC-3', HOXD8_R: 5'-AGCGACTGTAGGTTTGTCTTC-3', GAPDH_F: 5'-ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3' , GAPDH_R: 5'-TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA-3'.

4.14 Απομόνωση και qPCRs των start-RNAs

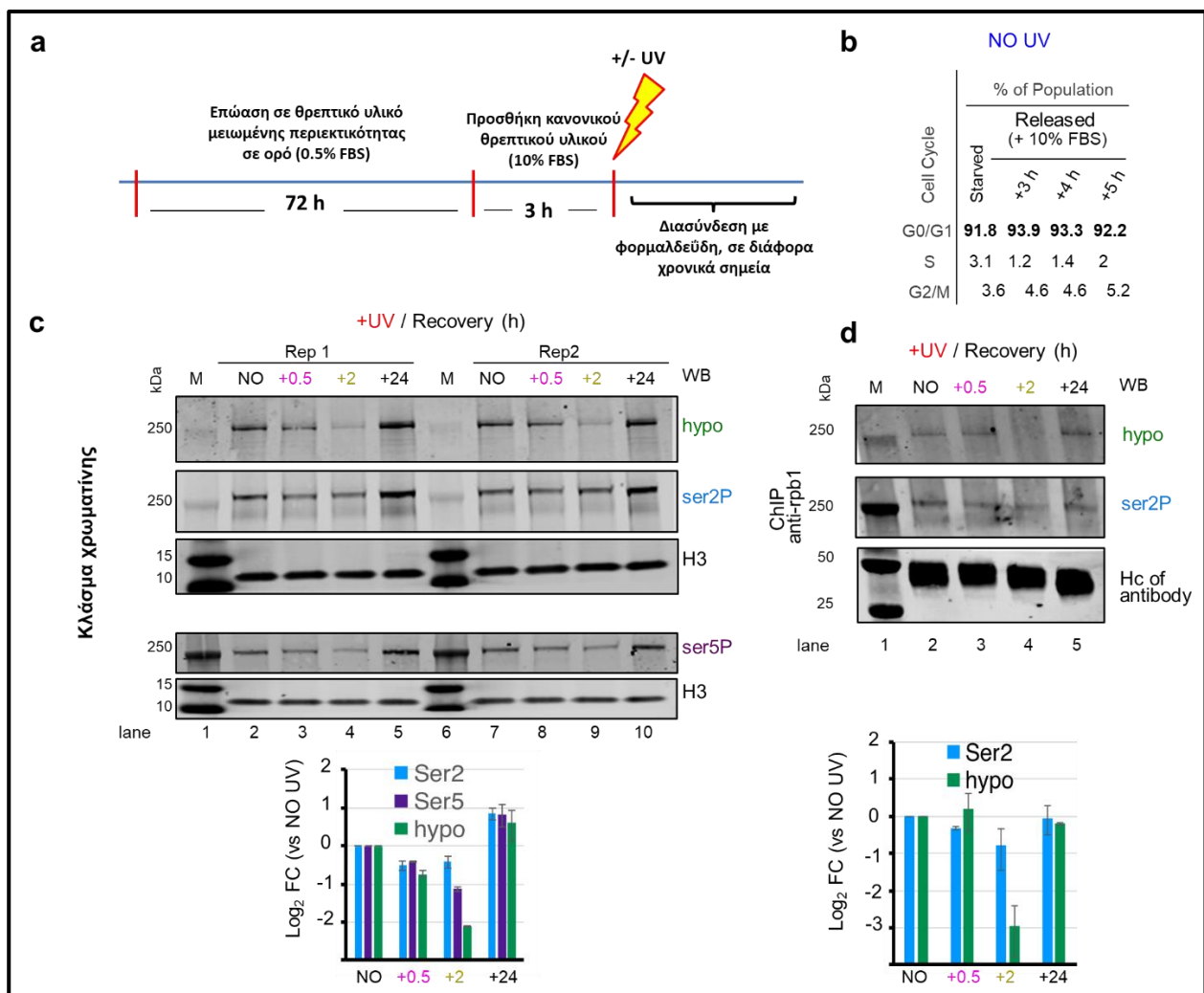
Για να απομονωθούν και να μελετηθούν τα start-RNAs (RNA μικρότερα από 200 νουκλεοτίδια) χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό τα Qiagen RNeasy MinELute Cleanup Kit (Cat. No. 74204) και Qiagen miRNeasy Mini Kit (Cat. No. 217004), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Για να υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου και παρακολούθησης των ενζυματικών αντιδράσεων στις οποίες υποβλήθηκαν τα start-RNAs, στο πειραματικό υλικό προστέθηκε ένα RNA ολιγονουκλεοτίδιο γνωστής αλληλουχίας (spike-in μόριο) (oGAB11: 5'-AGUCACUUAGCGAUGUACACUGACUGUG-3', σύνθεση και απομόνωση από την IDT). Μετά την απομόνωση, στα μόρια των start-RNAs (75 ng – 300 ng) και spike-in (10 μόρια spike-in/κύτταρο) προστέθηκε, μέσω αντίδρασης λιγάσης, η αλληλουχία DNA linker 1 (/5rApp/CTGTAGGCACCATCAAT/3ddC/, σύνθεση και απομόνωση από την IDT). Συγκεκριμένα, τα δείγματα αποδιατάχθηκαν για 2 λεπτά στους 80 °C και στη συνέχεια προστέθηκαν 4,8 μl 50% PEG, 2 μl 10x RNA ligase Buffer, 200 ng DNA linker 1, RNase free H₂O και 0,5 μl truncated RNA ligase (NEB, Cat. No. M0351S), σε τελικό όγκο 20 μl. Η αντίδραση λιγάσης επώαστηκε για 3 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια στο μίγμα προστέθηκε H₂O σε τελικό όγκο 100 μl και πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση RNA με προσθήκη αιθανόλης (3 όγκοι 100% αιθανόλη, 1/10 όγκου NaAc, PH 5.2 και 10 μg γλυκογόνο (ThermoFischer Scientific, Cat Number AM9510) στους -80 °C για 16 ώρες. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά τα εξής: φυγοκέντρηση στους 4 °C για 15 λεπτά στις 14.000 rpm, απομάκρυνση υπερκείμενου και πλύσιμο με αιθανόλη 70% και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 14.000 rpm, 4 °C. Το RNA απομονώθηκε τελικά σε όγκο 10 μl και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας το Invitrogen Superscript II (Cat Number 18064014) μέσω του εκκινητή oLSC003:/5'Phos/TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG/iSp18/CACTCA/iSp18/AATGATACGGCGACCACCGATCCGACGATCATTGATGGTGCCTACAG3'. Για τις αντιδράσεις qPCR που πραγματοποιήθηκαν, ελέγχθηκε η παρουσία start-RNAs σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους όπου χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι πρόσθιοι

εκκινητές (OSBPL9: 5'-ATTGGCGGCTCCCAAGAT-3', SSBP1: 5'-GTGAGGGAGGAAGGGATAGC-3', IFIT1: 5'-TCTCAGAGGAGCCTGGCTAA-3', KPNA6: 5'-ATTTGGCGAGAGCCTGTCT-3') και ένας κοινός ανάστροφος εκκινητής (oNTI230: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3') ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία του εκκινητή oLSC003, που χρησιμοποιήθηκε για την αντίστροφη μεταγραφή των μορίων (βλέπε παραπάνω).

5 Αποτελέσματα

5.1 Αναδιοργάνωση των ισομορφών της Pol II ως απόκριση στη UV ακτινοβολία.

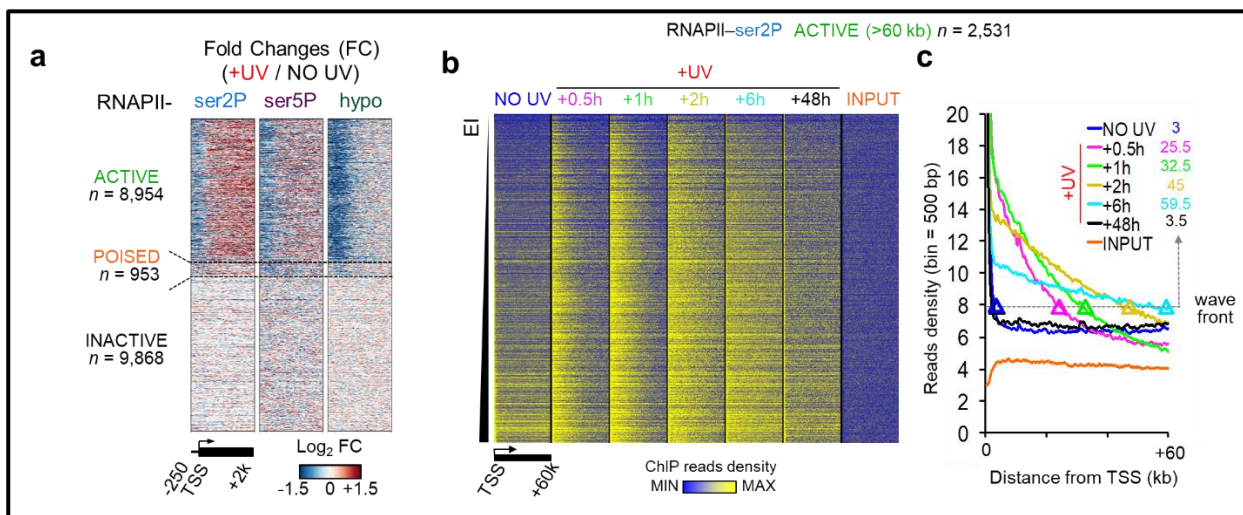
Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, ελέγχθηκαν οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στα επίπεδα και την κατανομή των διάφορων ισομορφών της Pol II, μετά την έκθεση σε UV, σε φυσιολογικούς (Vh10-htert) ινοβλάστες δέρματος συγχρονισμένους στην φάση G₀/G₁ του κυτταρικού κύκλου (Εικόνες 18a, b). Πειράματα Western-Blot, τόσο του κλάσματος χρωματίνης (Εικόνα 18c), όσο και χρωματίνης που έχει κατακρημνισθεί με αντίσωμα έναντι της υπομονάδας rpb1 (Εικόνα 18d), έδειξαν πως τα επίπεδα της πολυμεράσης έναρξης της μεταγραφής (Pol II-hypo) μειώνονται σημαντικά μετά την έκθεση σε UV. Αντίθετα, μικρότερες μεταβολές εντοπίστηκαν για τις ισομορφές Pol II-ser5P και Pol II-ser2P (Εικόνες 18c, d).



Εικόνα 18. α. Πειραματικό χρονοδιάγραμμα που απεικονίζει την διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον συγχρονισμό, ακτινοβολία και διασύνδεση με φορμαλδεΐδη, κυττάρων ινοβλαστών στη φάση G₀/G₁ του κυτταρικού κύκλου. β. Πίνακας όπου απεικονίζονται τα ποσοστά των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πριν (starved, 0.5% FBS) και μετά (released, 10% FBS) την προσθήκη ορού στο θρεπτικό υλικό

της καλλιέργειας. **c.** (Πάνω) Ανοσοστύπωμα κατά Western του κλάσματος χρωματίνης μη ακτινοβολημένων (NO UV) και ακτινοβολημένων (+0.5 h, +2 h, +24 h) Vh10 κυττάρων, που αφορά τις Pol II-ser2P, Pol II-hygro και Pol II-ser5P. Η πρωτεΐνη ιστόνη 3 (H3) χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική δύο πανομοιότυπων πειραμάτων. (Κάτω) Ποσοτικοποίηση του **c.** Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M). **d.** (Πάνω) Ανοσοστύπωμα κατά Western κλάσματος χρωματίνης ανοσοκατακρημνισμένης έναντι της υπομονάδας *grb1* της Pol II μη ακτινοβολημένων (NO UV) και ακτινοβολημένων (+0.5 h, +2 h, +24 h) Vh10 κυττάρων, που αφορά τις Pol II-ser2P και Pol II-hygro. Ηc: βαριά αλυσίδα (heavy chain) αντισώματος. (Κάτω) Ποσοτικοποίηση του **d.**

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν CHIP-seq πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, σε μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα Vh10 κύτταρα, τα οποία έδειξαν πως, μετά την ακτινοβολήση με UV, πραγματοποιείται μια εκτεταμένη αναδιοργάνωση στις διάφορες ισομορφές της Pol II, η οποία χαρακτηρίζεται από μείωση της Pol II-hygro στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων και ταυτόχρονη αύξηση της Pol II-ser2P (κυρίως) αλλά και της Pol II-ser5P στο εσωτερικό των γονιδίων (Lavigne et al. 2017) (Εικόνα 19a-c).

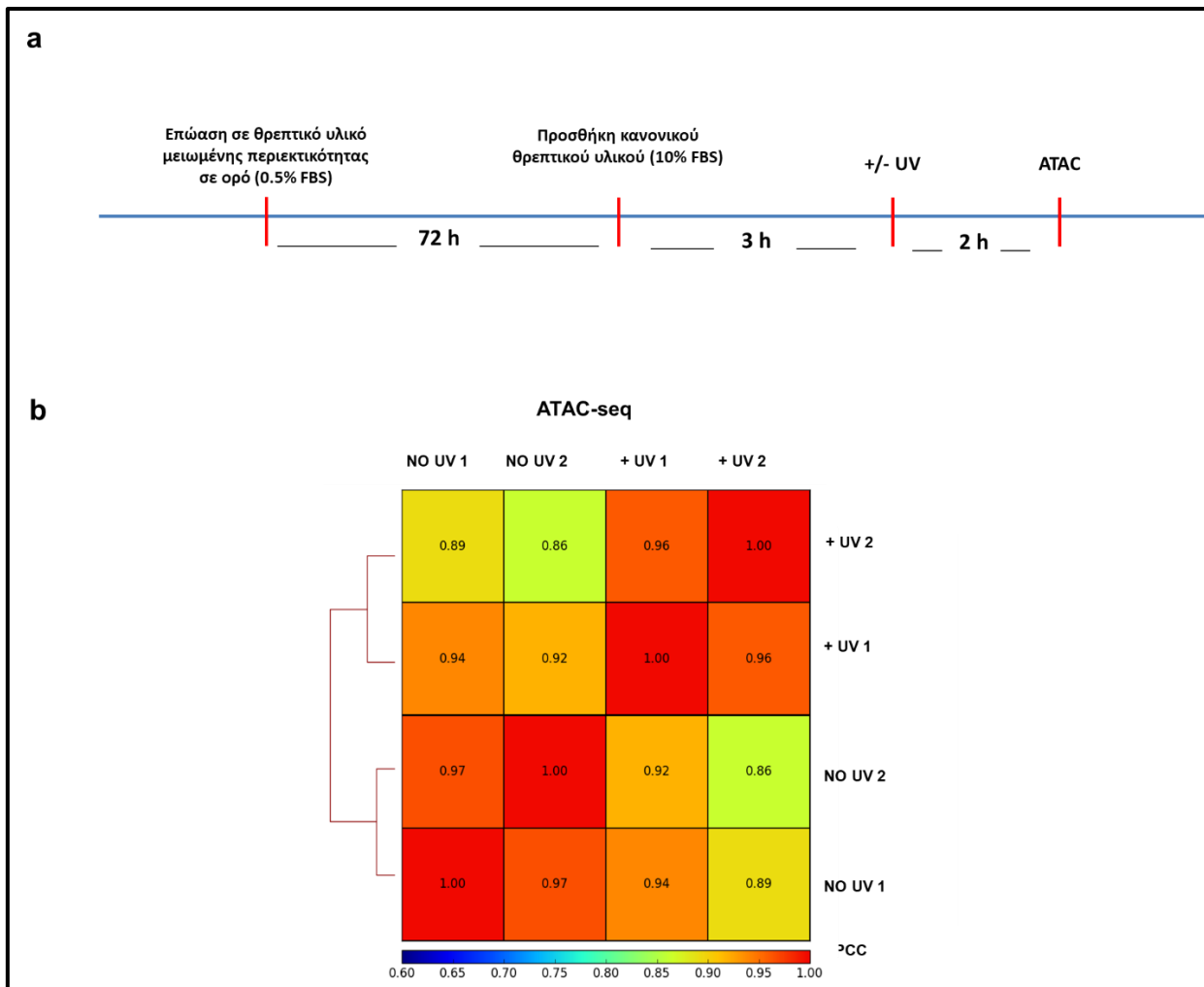


Εικόνα 19. a. Διάγραμμα τύπου heatmap όπου απεικονίζεται η Log₂ διαφορά (Log₂FC) των Pol II (RNAPII)-ser2P, -ser5P και -hygro μεταξύ ακτινοβολημένων (+UV, 8J/m²) και μη ακτινοβολημένων (NO UV) κυττάρων. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές 250 bp ανοδικά και 2 kb καθοδικά του TSS των γονιδίων. **b.** Διάγραμμα τύπου heatmap όπου απεικονίζεται το σήμα πειραμάτων CHIP-seq έναντι της Pol II-ser2P σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV) κύτταρα, σε διάφορα χρονικά σημεία μετά την ακτινοβολήση. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές από το TSS έως και 60 kb καθοδικά του TSS, για τα ενεργά γονίδια που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο των 60 kb. **c.** Διάγραμμα απεικόνισης προφίλ μέσων τιμών του CHIP-seq σήματος του **c.** Στο διάγραμμα επισημαίνεται με τρίγωνο η θέση του μεταγραφικού κύματος (wave front) σε κάθε πειραματική χρονική στιγμή.

Τα ευρήματα αυτά, αποτέλεσαν μέρος μιας δημοσιευμένης εργασίας (Lavigne et al. 2017) και ταυτόχρονα έθεσαν νέα ερωτήματα σχετικά τόσο με τη δομή και διαμόρφωση της χρωματίνης στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων μετά την έκθεση σε UV, όσο και για τον μηχανισμό μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ανωτέρω ανακατανομή των διάφορων ισομορφών της Pol II στα γονίδια των ακτινοβολημένων κυττάρων. Τα ερωτήματα αυτά έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστούν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

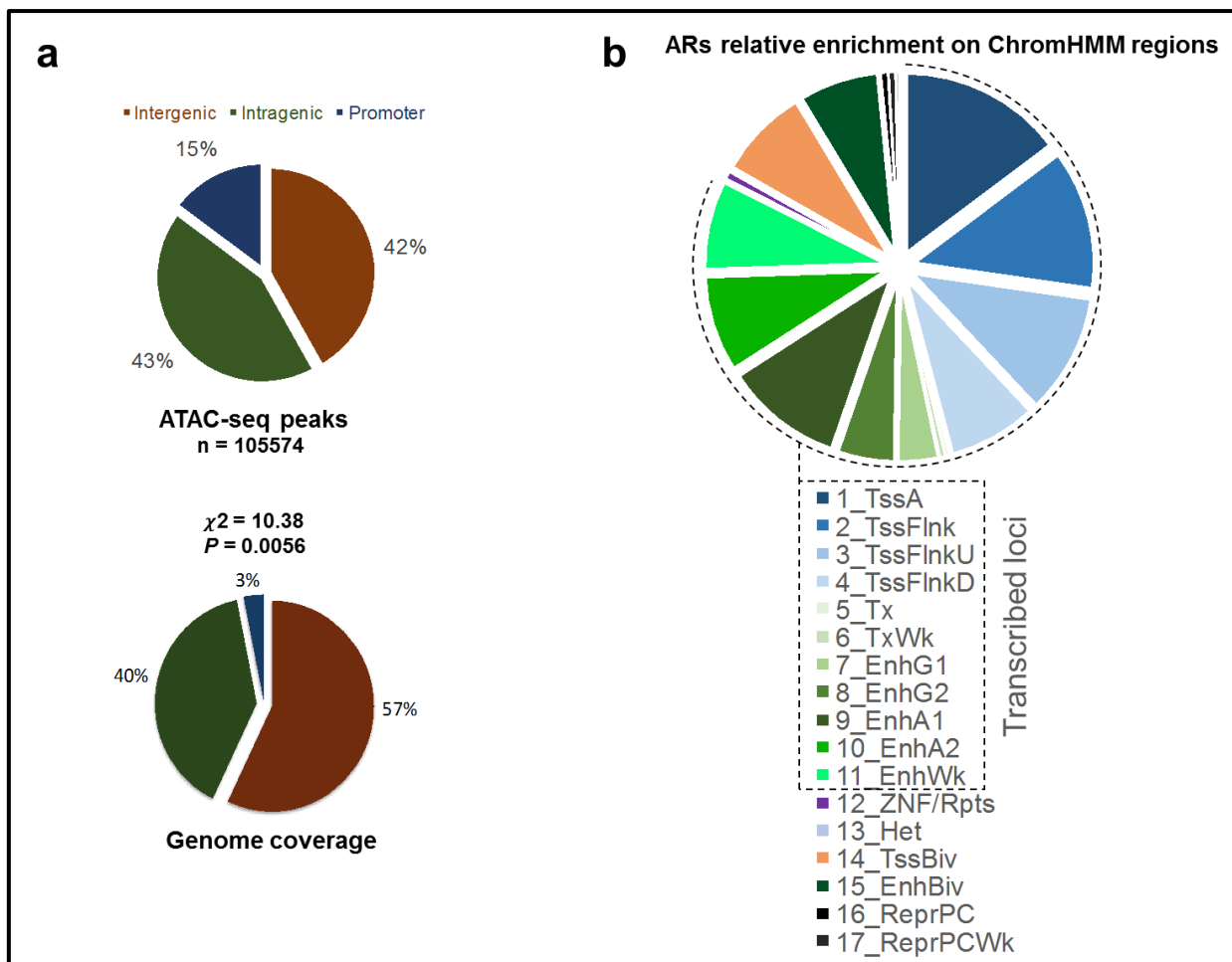
5.2 Η προσβασιμότητα της χρωματίνης αυξάνει μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία

Πρόσφατα ευρήματα έδειξαν πως η έκθεση σε UV ακτινοβολία αφενός προκαλεί αύξηση του nRNA σε περιοχές κοντά στους υποκινητές (Andrade-Lima et al. 2015; Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017), αφετέρου προκαλεί απελευθέρωση μορίων Pol II από τις θέσεις PPP (Lavigne et al. 2017; Borisova et al. 2018). Για να αποσαφηνίσουμε τον αντίκτυπο που έχει η UV στο χρωματινικό περιβάλλον των ρυθμιστικών περιοχών της μεταγραφής, οι οποίες θα μπορούσαν να συμμετάσχουν στη διατήρηση μιας τέτοιας απόκρισης, θελήσαμε πρώτα να χαρακτηρίσουμε της αλλαγές που συμβαίνουν στην προσβασιμότητα της χρωματίνης, σε γονιδιωματικό επίπεδο. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο ATAC-seq (Corces et al. 2017) στο κυτταρικό μας σύστημα που περιλαμβάνει την ακτινοβολία ινοβλαστών ανθρώπινου δέρματος (φυσιολογικοί ινοβλάστες δέρματος (Vh10-htert)), συγχρονισμένους στις αρχές της φάσης G₁ του κυτταρικού κύκλου, με χαμηλές δόσεις UV-C (Εικόνα 20a). Δύο επαναλήψεις βιολογικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV, 2 h) κύτταρα. Στατιστική ανάλυση των πειραμάτων ATAC-seq έδειξε υψηλές τιμές συσχέτισης (Εικόνα 20b), γεγονός που υποδηλώνει πως η προσβασιμότητα της χρωματίνης θα μπορούσε να μετρηθεί με αξιοπιστία, στα δείγματα αυτά.



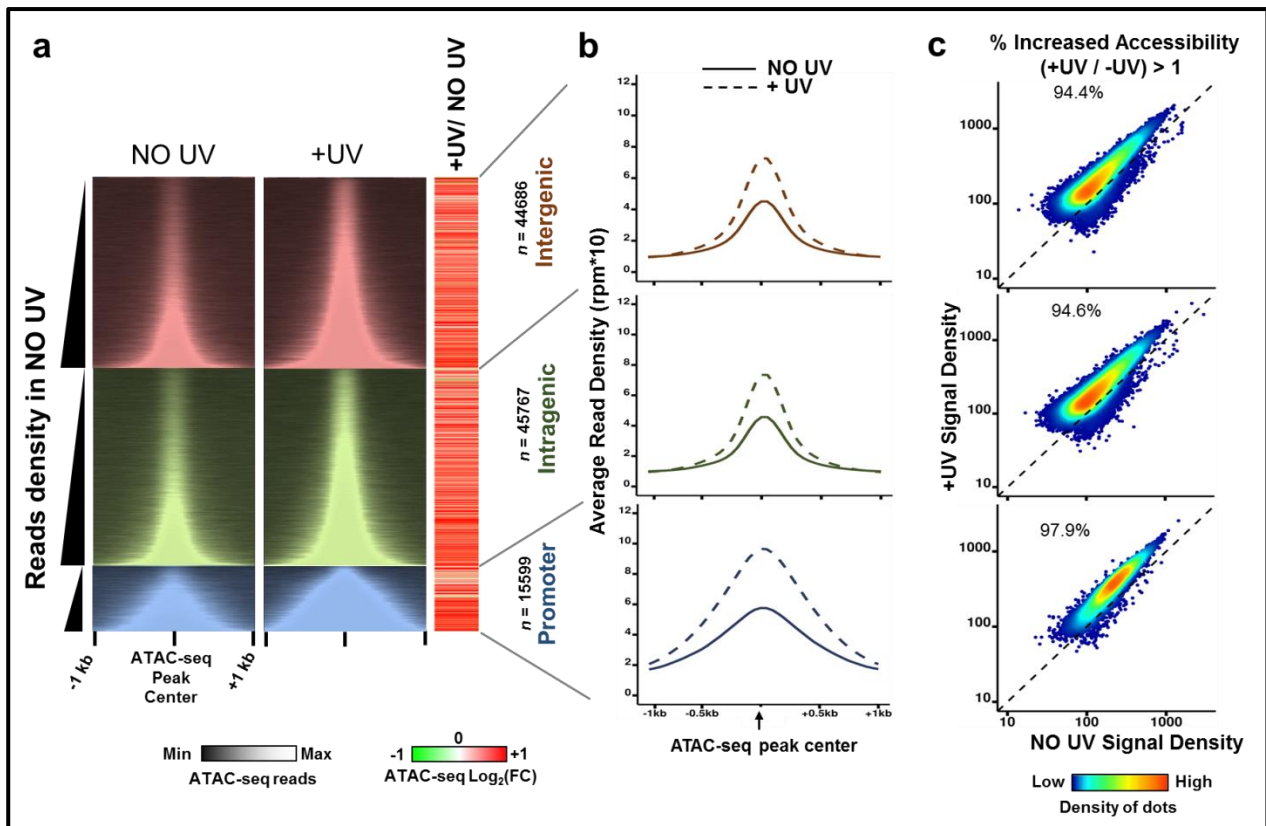
Εικόνα 20. α. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού χρονοδιαγράμματος όπως αυτό ακολουθήθηκε στα πειράματα ATAC-seq. Ινοβλάστες δέρματος (VH10-htert, βλέπε Υλικά και Μέθοδοι) διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπητίου. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό τους αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό μειωμένο σε περιεκτικότητα ορού (FBS 0.5%) και τα κύτταρα επωάζονται σε αυτό για 3 μέρες. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστίθεται θρεπτικό υλικό φυσιολογικής περιεκτικότητας ορού (10% FBS) και έπειτα από 3 ώρες αυτά ακτινοβολούνται (ή όχι) με UV ακτινοβολία (15 J/m²). Στα κύτταρα πραγματοποιείται η τεχνική ATAC, 2 ώρες μετά την ακτινοβολήση. **β. Απεικόνιση του συντελεστή συσχέτισης Pearson για τα πειράματα ATAC-seq μη ακτινοβολημένων (NO UV 1, NO UV 2) και ακτινοβολημένων κυττάρων (+ UV 1, +UV 2).** Ο συντελεστής υπολογίστηκε με βάση το σήμα ATAC-seq σε όλο το γονιδίωμα, χωρίζοντάς το σε περιοχές των 3kb και μετρώντας το σήμα ATAC-seq σε αυτές.

Για την ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός κορυφών (peaks) στις διάφορες πειραματικές συνθήκες. Χαρτογραφήθηκαν συνολικά 105.574 περιοχές ανοικτής χρωματίνης σε όλα τα δείγματα. Οι προσβάσιμες περιοχές (Accessible Regions, ARs) κατηγοριοποιήθηκαν στη συνέχεια σε σχέση με τα γονίδια Refseq και καταγράφηκε η κατανομή τους σε υποκινητές (promoters), ενδογονιδιακές (intragenic) και διαγονιδιακές (intergenic) περιοχές (Εικόνα 21a). Ακόμη, κατηγοριοποίηση των ARs με βάση τις προβλέψεις του ChromHMM μοντέλου έδειξαν ότι μεγάλο ποσοστό των ARs κατανέμεται σε μεταγραφόμενες ρυθμιστικές περιοχές (Εικόνα 21b).



Εικόνα 21. α. Κατανομή των ATAC-seq peaks σε περιοχές υποκινητών (promoters, $-/+2\text{kb}$ από το TSS), ενδογονιδιακές (intragenic) και διαγονιδιακές (intergenic) περιοχές. Η κατανομή συγκρίνεται με τα ποσοστά που καλύπτουν οι αντίστοιχες περιοχές στο γονιδίωμα (Genome coverage). Το στατιστικό τεστ χ^2 πραγματοποιήθηκε για να εξακριβωθεί αν οι παρατηρούμενες αλλαγές αποδίδονται στην τυχαιότητα ή όχι. **β. Κατηγοριοποίηση των ARs με βάση το ChromHMM μοντέλο.** Η περιοχές που επισημαίνονται με διακεκομμένη γραμμή αποτελούν μεταγραφικά ενεργές ρυθμιστικές περιοχές.

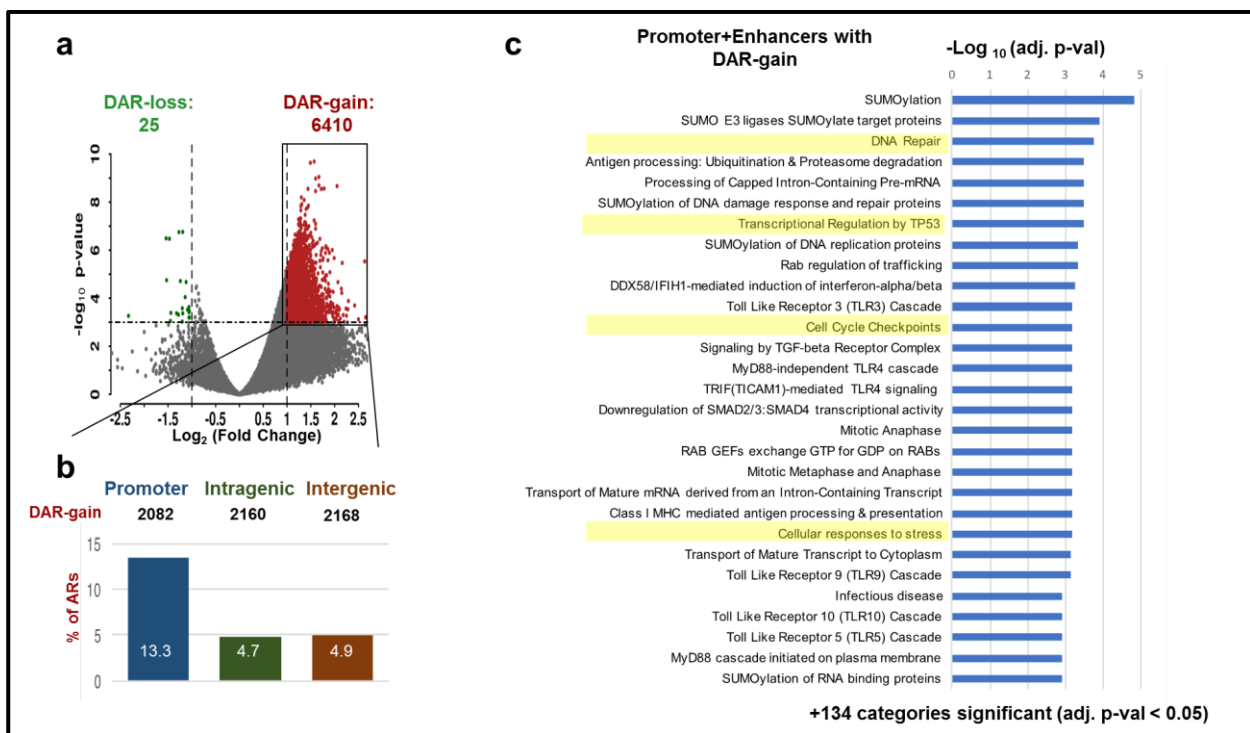
Τα δεδομένα μας έδειξαν μια ευρεία αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης μετά την έκθεση σε UV (Εικόνα 22a, b). Ειδικότερα, η ποσοτικοποίηση των μεταβολών του ATAC-seq σήματος πριν και μετά την έκθεση σε UV στις AR περιοχές, εκφρασμένη ως λόγος των σημάτων ATAC-seq +UV/ ATAC-seq -UV, έδειξε πως το 97.9% των υποκινητών, το 94.4% των ενδογονιδιακών και το 94.4% των διαγονιδιακών AR σημειώνει αύξηση στην προσβασιμότητα χρωματίνης (Εικόνα 22c).



Εικόνα 22. Αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης ως απόκριση στην UV ακτινοβολία. **a.** Θερμικός χάρτης (heatmap) που απεικονίζει το ATAC-seq σήμα σε γονιδιωματικές περιοχές 1 kb γύρω από το κέντρο των κορυφών (peaks) ATAC-seq, σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV, 15J/m²) κύτταρα. Τα peaks κατηγοριοποιήθηκαν ως προς τη θέση τους σε σχέση με τα RefSeq γονίδια (peaks σε υποκινητές (promoters), ενδογονιδιακά (intragenic) peaks και διαγονιδιακά (intergenic) peaks). Τα peaks ταξινομήθηκαν κατά αυξανόμενη ένταση σήματος (όπως αυτή καθορίστηκε πριν την έκθεση σε ακτινοβολία). **b.** Διαγράμματα απεικόνισης προφίλ μέσων τιμών του ATAC-seq σήματος σε μη ακτινοβολημένα (NO UV, συνεχής γραμμή) και ακτινοβολημένα (+UV, διακεκομμένη γραμμή) στις γονιδιωματικές περιοχές όπως αυτές καθορίστηκαν στο **a**. Το σήμα που απεικονίζεται αντιστοιχεί σε γονιδιωματικές περιοχές 1kb εκατέρωθεν του κέντρου των ATAC-seq peaks. **c.** Σύγκριση του ATAC-seq σήματος στις περιοχές AR, κατηγοριοποιημένες όπως στο **a** πριν (NO UV) και μετά (+UV) την έκθεση σε UV. Για την απεικόνιση της σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν διάγραμμα θερμικής διασποράς (heat density scatter plots).

Εν συνεχεία, για να προσδιορίσουμε τις περιοχές που παρουσιάζουν τις σημαντικότερες αλλαγές στην προσβασιμότητα της χρωματίνης μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των διαφορικά προσβάσιμων περιοχών (Differentially Accessible Regions, DARs). Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν αυστηρά κατώτερα όρια τόσο από άποψη μεγέθους μεταβολής σήματος ($\text{Log}_2 \text{FC} > 1$), τόσο από άποψη στατιστικής σημαντικότητας ($P\text{-value} < 0.001$). Η ανάλυση αυτή έδειξε πως 6410 ARs εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία (ονομάζονται DAR-gain στη διατριβή αυτή), ενώ αντίθετα μόνο 25 γενετικοί τόποι έδειξαν σημαντική μείωση της προσβασιμότητας της χρωματίνης (DAR-loss) (Εικόνα 23a). Παρατηρήθηκε πως το 13,3% των ARs που βρέθηκαν σε περιοχές υποκινητών (promoter ARs) ανήκει επίσης στις DAR-gain περιοχές, υποδηλώνοντας ένα λειτουργικό «άνοιγμα» της χρωματίνης στις TSS περιοχές (Εικόνα 23b). Για να αποκαλυφθούν περισσότερα λειτουργικά χαρακτηριστικά για τα γονίδια που συσχετίζονται με τις DAR-

gain περιοχές επιλέχθηκαν (α) γονίδια, στους υποκινητές των οποίων βρίσκονται DAR-gain περιοχές και (β) γονίδια που ελέγχονται από ενισχυτές (σύμφωνα με τη βάση δεδομένων FANTOM5) οι οποίοι εμφανίζονται ως DAR-gain περιοχές στην ανάλυσή μας. Στις γονιδιωματικές περιοχές που αναφέρονται παραπάνω, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Reactome (Fabregat et al. 2016). Παρατηρήθηκε πως στα συγκεκριμένα γονίδια εντοπίζονται στατιστικώς σημαντικά (διορθωμένη (adjusted) τιμή $P < 0.05$) εμπλουτισμένα βιολογικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική απόκριση στο στρες, την επιδιόρθωση DNA, την ρύθμιση της μεταγραφής μέσω της πρωτεΐνης TP53 και τα σημεία ελέγχου κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 23c).



Εικόνα 23. Μελέτη των διαφορικά προσβάσιμων περιοχών (Differentially Accessible Regions, DARs) μετά από έκθεση σε UV. α. Διάγραμμα τύπου κρατήρα ηφαιστειού (volcano plot) που αναπαριστά τις DAR περιοχές, μεταξύ ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Οι περιοχές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση (DAR-gain) ή μείωση (DAR-loss) της προσβασιμότητας της χρωματίνης μετά την έκθεση σε UV, αναπαριστώνται με κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα. β. Ποσοστά των DAR-gain περιοχών όπως αυτά διανέμονται σε υποκινητές (promoters), ενδογονιδιακές (intragenic) και διαγονιδιακές (intergenic) περιοχές. γ. Γονιδιακή οντολογία (Gene Ontology) των DAR-gain γονιδίων. Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη ανάλυση ήταν εκείνα που είτε i) στους υποκινητές τους ανιχνεύθηκαν DAR-gain περιοχές, είτε ii) ελέγχονται από ενισχυτές που εμφανίζονται ως DAR-gain περιοχές (βλέπε κείμενο). Τα μοριακά μονοπάτια ταξινομήθηκαν κατά μειούμενη στατιστική σημαντικότητα. Τα μονοπάτια που σχετίζονται με την απόκριση στο γενετοξικό στρες υπογραμμίζονται με κίτρινο χρώμα.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν πως, ενώ η αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης είναι διάχυτη μετά τη UV, γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση σε γενετοξικό στρες φαίνεται να υφίστανται την μεγαλύτερη αλλαγή. Από την άλλη μεριά, ο μεγάλος αριθμός γενετικών τόπων που εμφανίζουν αύξηση στην προσβασιμότητα χρωματίνης σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα των συνδεδεμένων κατηγοριών βιολογικών μονοπατιών (Εικόνα 23c), οφείλεται πιθανότατα στη

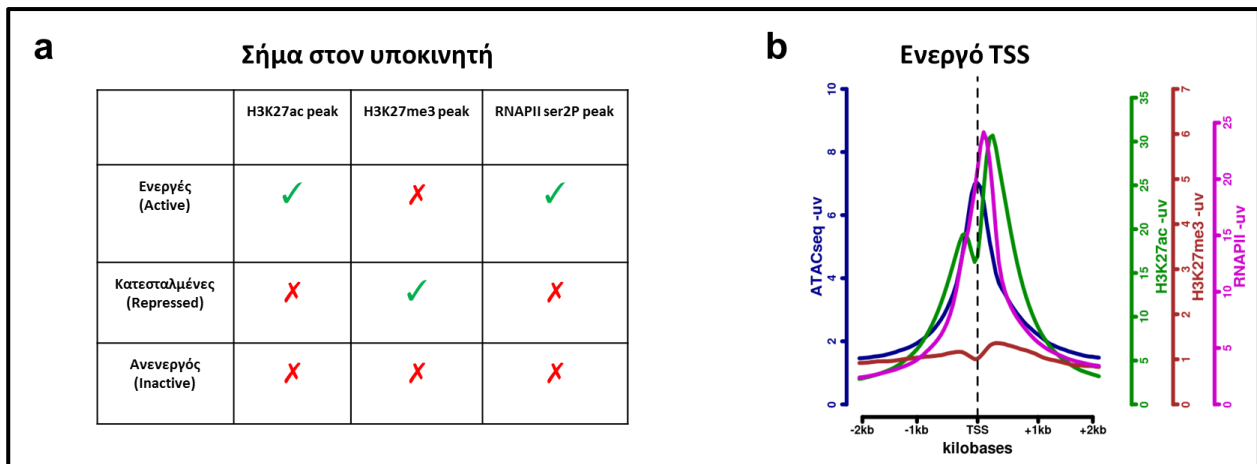
γενικευμένη απελευθέρωση των μορίων RNAPII από τις θέσεις PPP, σε όλα τα ενεργά γονίδια μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία (Lavigne et al. 2017). Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν πως η ακτινοβολία με UV προκαλεί αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης σε ήδη προσβάσιμες ρυθμιστικές γονιδιωματικές περιοχές των κυττάρων, φανερώνοντας πως οι συγκεκριμένες περιοχές δεν «κλείνουν» μετά από έκθεση σε ήπιες δόσεις UV ακτινοβολίας, υποδεικνύοντας ταυτόχρονα ένα μοντέλο αντίθετο με την υπόθεση της μεταγραφικής σίγασης μετά από UV ακτινοβολία.

5.3 Μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της χρωματίνης ως απόκριση στην έκθεση σε UV ακτινοβολία

5.3.1 Η ακτινοβολία δεν αλλάζει τα πρότυπα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων H3K27ac και H3K27me3, σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος

Ένας αριθμός μελετών έχει δείξει πως ο ρυθμός αναπλήρωσης, η τροποποίηση ή/και η αποικοδόμηση των ιστονών γύρω από τις περιοχές της βλάβης αποτελούν βασικά βήματα μιας συντηρημένης κυτταρικής απόκρισης που βοηθά τα κύτταρα να αντιμετωπίσουν το γενοτοξικό στρες (Hauer and Gasser 2017). Ωστόσο, ιδιαίτερα στην περίπτωση της απόκρισης των κυττάρων στην UV ακτινοβολία, λίγα είναι γνωστά για τις αλλαγές της χρωματίνης στις ρυθμιστικές γονιδιωματικές περιοχές. Με σκοπό να ερμηνευθούν καλύτερα οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην προσβασιμότητα της χρωματίνης (βλέπε Κεφάλαιο 5.2) και να αποσαφηνιστούν τυχόν επιπτώσεις τους στις δυναμικές της μεταγραφής, μελετήθηκε η διαφορική παρουσία δύο σημαντικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ιστονών που σχετίζονται με την μεταγραφική ενεργοποίηση (H3K27ac) και την μεταγραφική σίγαση (H3K27me3), αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα Vh10-htert κύτταρα (+UV). Αναλύθηκαν ξεχωριστά τα TSS (TSS που αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνη και μακρά μη-κωδικά RNA) και τα eTSS (TSS των ενισχυτών που προσδιορίζονται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων FANTOM5). Τα δεδομένα ChIP-seq από τα μη ακτινοβολημένα (NO UV) κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιοριστούν τα υποσύνολα των ενεργών (παρουσία peak για H3K27ac και RNAPII (Pol II)-ser2P), κατεσταλμένων (παρουσία peak μόνο για H3K27me3) και ανενεργών (απουσία peak για H3K27ac, H3K27me3 και Pol II) γονιδιωματικών τόπων (Εικόνα 24).

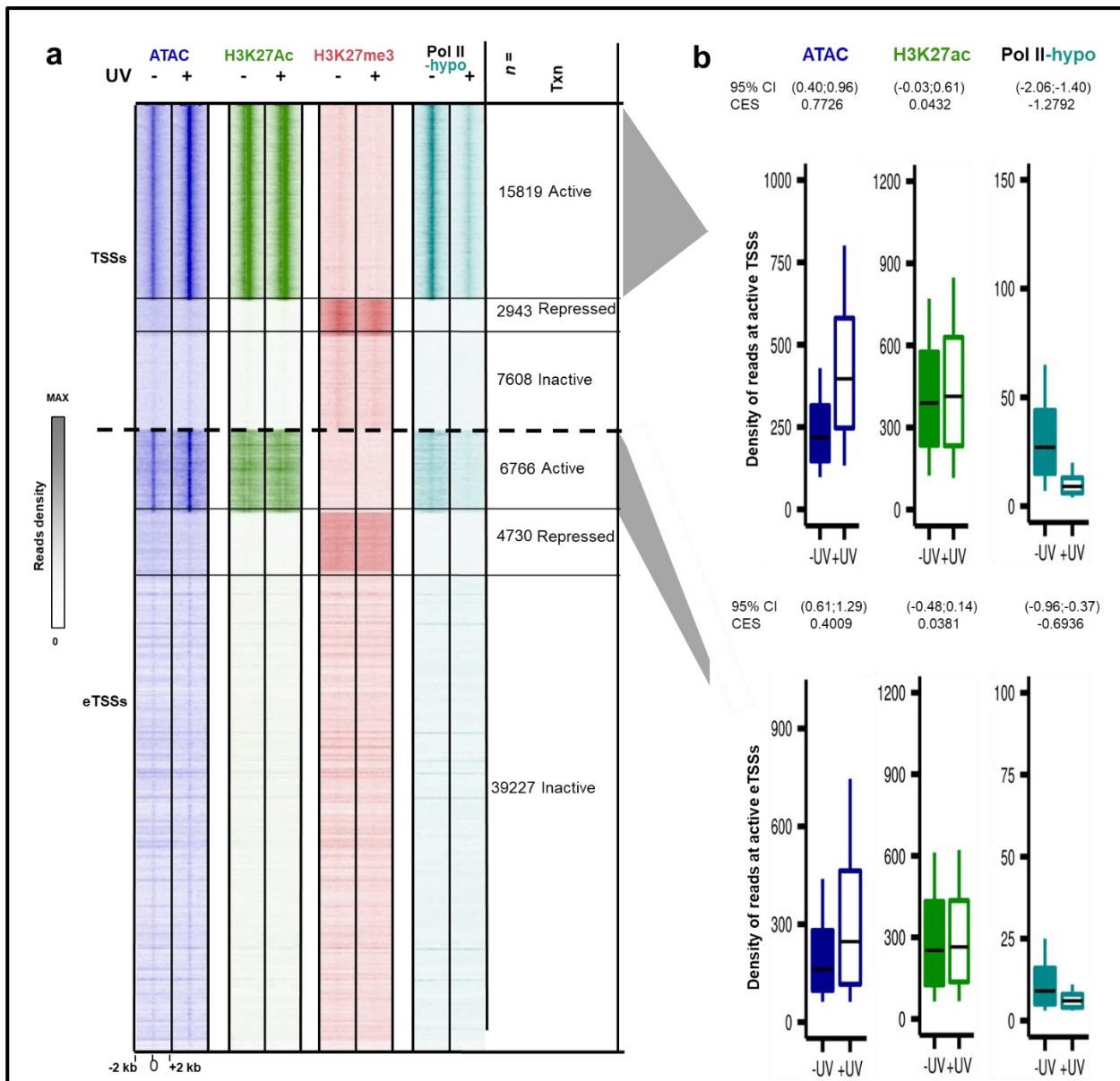


Εικόνα 24. Καθορισμός ενεργότητας γονιδίων και ενισχυτών στα VH10 κύτταρα σε συνθήκες ελέγχου (NO UV).
a. Πίνακας που αποτυπώνει τον τρόπο κατηγοριοποίησης των περιοχών TSS και eTSS σε ενεργές, κατεσταλμένες και ανενεργές. **b.** Διαγράμματα απεικόνισης προφίλ μέσω των τιμών του σήματος ATAC-seq καθώς και του σήματος CHIP-seq των H3K27ac (πράσινο), H3K27me3 (κόκκινο) και Pol II ser2 (ροζ) στα ενεργά TSS. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές 2kb εκατέρωθεν του TSS.

Παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης στα ενεργά TSS (που αντιστοιχούν σε μεγάλο βαθμό στο άνοιγμα των περιοχών των υποκινητών που περιγράφεται παραπάνω, βλέπε Εικόνες 22, 25 ATAC) και eTSS (ATAC, 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, (Confidence Interval, CI) αποκλείει το 0)). Η αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης στις περιοχές αυτές φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με την γενικευμένη μείωση του σήματος της Pol II-hypro (95% CI αποκλείει το 0) στα ενεργά TSS και eTSS (Εικόνα 25, Pol II-hypro).

Παράλληλα, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα της τροποποίησης H3K27ac παραμένουν σταθερά στους ενεργούς γονιδιωματικούς τόπους, μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία (95% CI αποκλείει το 0). Ακόμη, δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση της τροποποίησης H3K27me3 στα ενεργά TSS και eTSS και αντίστροφα, δεν υπήρξε εμφάνιση της H3K27ac ή της Pol II σε ανενεργούς και κατεσταλμένους γονιδιωματικούς τόπους, μετά την έκθεση σε UV (Εικόνα 25; CHIP-seq H3K27ac/H3K27me3).

Ταυτόχρονα, ελέγχθηκε πριν και μετά (2h) την ακτινοβολία με UV, η γονιδιωματική κατανομή της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 (υπομονάδα του συμπλόκου PRC2, βλέπε Εισαγωγή, Κεφάλαιο 2.5.1.2), η οποία είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό της τροποποίησης H3K27me3. Τα πειράματα CHIP-seq που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν πως η μεθυλοτρανσφεράση EZH2 προσδένεται σε ομάδες γονιδίων οι οποίες δεν εμφανίζουν σήμα Pol II-ser2P (μη μεταγραφόμενα γονίδια, Εικόνα 26a-c) και συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την τροποποίηση H3K27me3, της οποίας καταλύει τον σχηματισμό (Εικόνα 26c). Ακόμη, τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως το πρότυπο πρόσδεσής του στη χρωματίνη παραμένει σταθερό μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία (Εικόνα 26a-c). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την τροποποίηση H3K27me3, υποδεικνύοντας την απουσία του PRC2 από τις ρυθμιστικές περιοχές των ενεργών γονιδίων μετά την UV, στα χρονικά σημεία που αυτή ελέγχθηκε και στις δόσεις UV στις οποίες εκτέθηκαν τα κύτταρα.



Εικόνα 25. Μελέτη της κατανομής των H3K27ac και H3K27me3 στις περιοχές των TSS και eTSSs ως απόκριση στην UV ακτινοβολία. α. Γράφημα τύπου heatmap που απεικονίζει την ένταση του σήματος των ATAC-seq, H3K27ac, H3K27me3 και Pol II-hypo ChIP-seq, πριν (NO UV) και μετά (+UV) την έκθεση σε UV ακτινοβολία, στις γονιδιωματικές περιοχές των ενεργών (active), κατεσταλμένων (repressed) και ανενεργών (inactive) TSS και eTSS, αντίστοιχα. Στο γράφημα απεικονίζονται οι περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS. β. Γραφήματα μορφής θηκογράμματος (boxplots) που παρουσιάζουν την ποσοτικοποίηση των ATAC-seq και ChIP-seq (H3K27ac και H3K27me3) δεδομένων που παρουσιάζονται στο α.

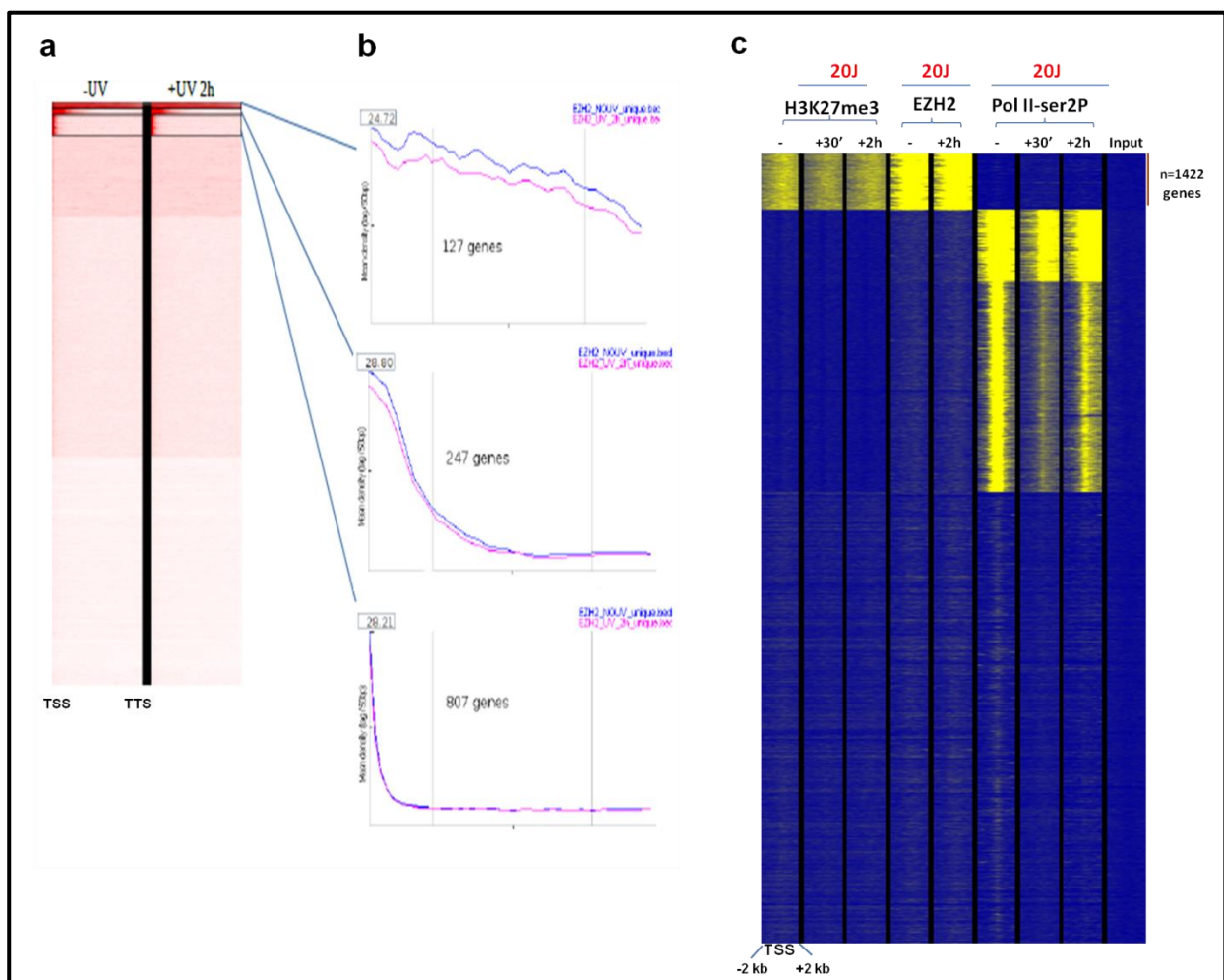
Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, πειράματα απομόνωσης ιστονών σε συνδυασμό με ανάλυση κατά Western Blot έδειξαν πως τα επίπεδα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των H3K27ac και H3K27me3 παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου (0-4 h) επανάκαμψης των κυττάρων μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία (Εικόνα 27).

Κατά συνέπεια, θεωρήθηκε πως η μείωση της ανιχνεύσιμης Pol II-hypo σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος (Εικόνες 19a; 25a, b), δεν οφείλεται σε καταστολή της μεταγραφικής έναρξης λόγω εμφάνισης της τροποποίησης H3K27me3/μείωσης της H3K27ac στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές ή σε άλλα

γεγονότα που οδηγούν σε «κλείσιμο» της δομής του υποκινητή στις ρυθμιστικές περιοχές της μεταγραφής (Εικόνες 22, 25 αύξηση ATAC-seq σήματος).

5.3.2 Επίδραση της UV ακτινοβολίας στο πρότυπο και τα επίπεδα της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης H3K79me2, σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος

Στα πλαίσια της μελέτης των επιγενετικών τροποποιήσεων της χρωματίνης και των πιθανών μεταβολών τους στα κύτταρα, ως απόκριση στην έκθεση σε UV ακτινοβολία, επιλέχθηκε να ελεγχθεί η μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K79me2. Η H3K79me2 αποτελεί μια ιστονική τροποποίηση συνδεδεμένη με την ενεργό μεταγραφή αφού αφενός εντοπίζεται στο εσωτερικό των ενεργών γονιδίων (Wood et al. 2018), αφετέρου το υπεύθυνο ένζυμο για τον σχηματισμό της, DOT1L, έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με την Pol II-ser2/5-P (Kim et al. 2012). Ειδικότερα, έχει βρεθεί πως τα επίπεδα της H3K79me2 σχετίζονται τόσο με τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων, όσο και με τον ρυθμό της μεταγραφής καθώς σε γονίδια με υψηλά επίπεδα H3K79me2, η ταχύτητα επιμήκυνσης της Pol II είναι μεγαλύτερη, σε σχέση με γονίδια όπου η H3K79me2 βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα (Jonkers et al. 2014; Veloso et al. 2014).

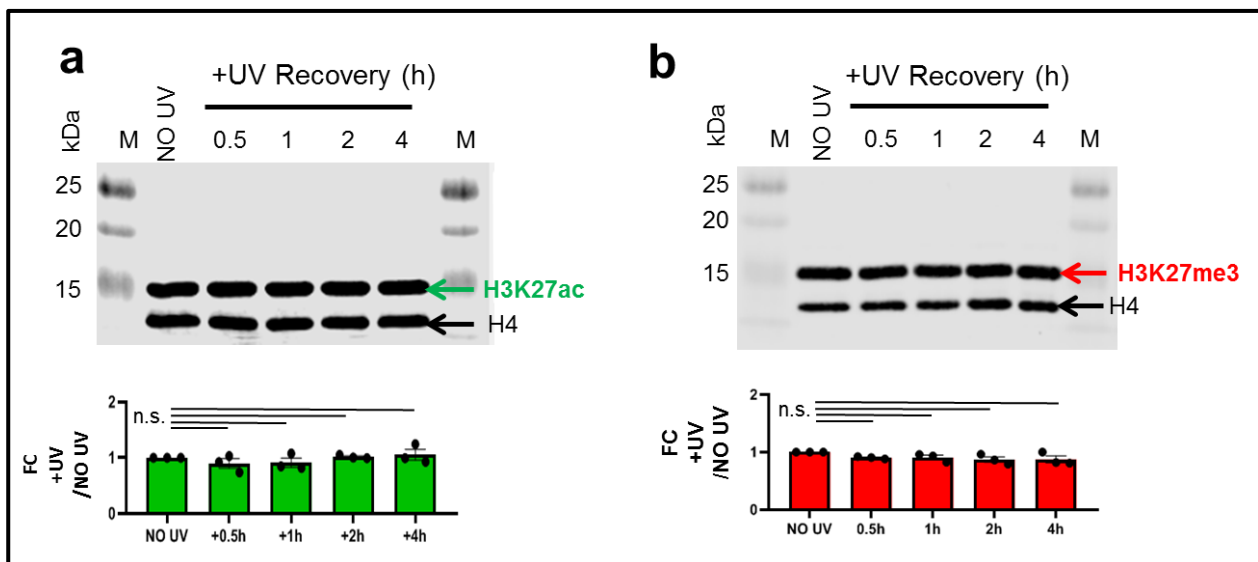


Εικόνα 26. α. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει την ένταση του ChIP-seq σήματος για την πρωτεΐνη EZH2 πριν (-UV) και 2 h μετά (+UV, 20J/m²) την έκθεση σε UV. Στο διάγραμμα αποτυπώνονται οι γονιδιωματικές περιοχές από το TSS μέχρι και το TTS. β. Διάγραμμα απεικόνισης προφίλ μέσω των τιμών του α, για τις ομάδες

γονιδίων που εμφανίζουν πρόσδεση EZH2. Με μπλε απεικονίζεται το EZH2 ChIP-seq σήμα πριν την ακτινοβολία ενώ με ροζ το σήμα μετά την ακτινοβολία με UV. **γ. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει την ένταση του ChIP-seq σήματος για τα H3K27me3, EZH2 και PolII-ser2P πριν (-UV) και μετά την έκθεση σε UV.** Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS. Οι δόσεις UV αλλά και τα χρονικά σημεία που πραγματοποιήθηκαν τα ChIP-seq πειράματα, αναφέρονται στην εικόνα.

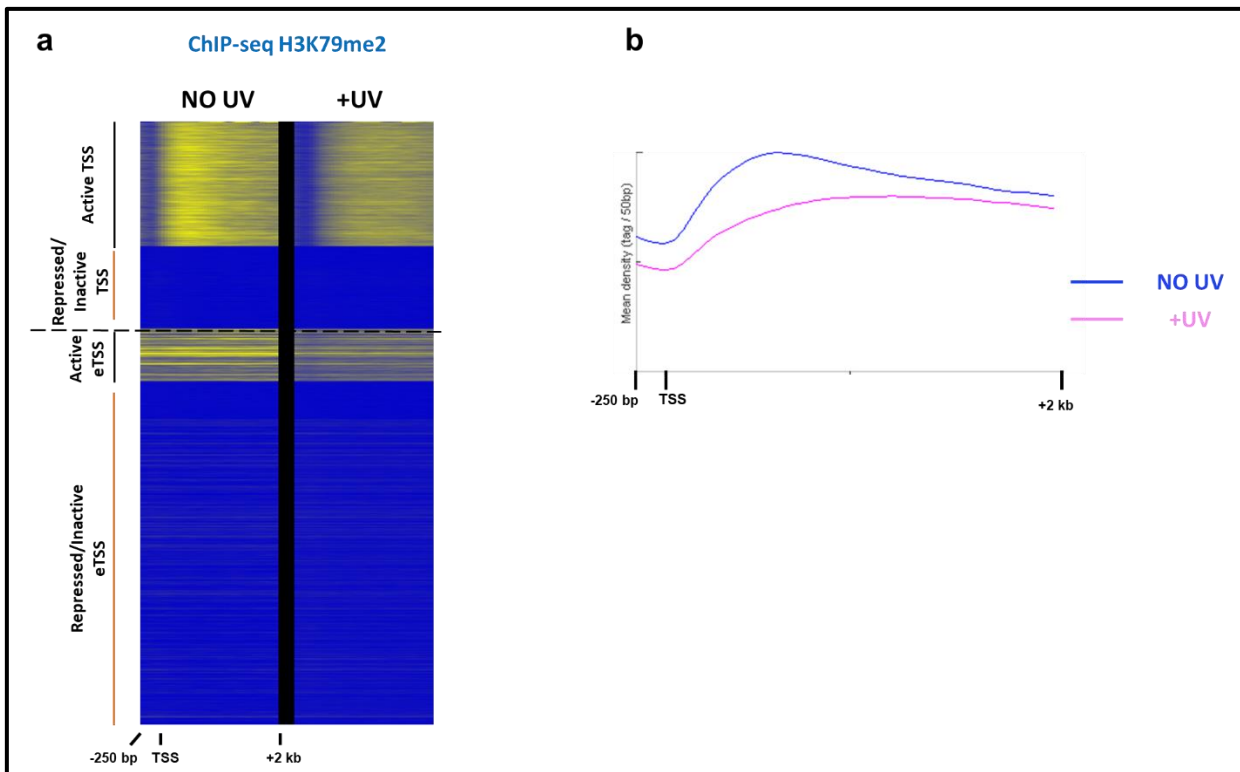
Τέλος, στη συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση έχουν αποδοθεί λειτουργίες στον DDR μηχανισμό αλλά και στην απόκριση στη UV ιδιαίτερα, καθώς έλλειψη του DOT1L ή της μεθυλιωμένης H3K79 έχει βρεθεί πως προκαλεί υπερευαισθησία στη UV (Wood et al. 2018).

Για να μελετηθεί η τροποποίηση H3K79me2, πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα σε μη ακτινοβολημένους (NO UV) και ακτινοβολημένους (+UV, 20J/m², 2 h) φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος (Vh10-htert). Τα πειράματά μας επιβεβαίωσαν πως η συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση εντοπίζεται στο κυρίως σώμα των ενεργών γονιδίων (Εικόνα 28a), συμφωνώντας με προηγούμενα δεδομένα (Steger et al. 2008). Παρατηρήθηκε ακόμη πως το πρότυπο της H3K79me2 δεν αλλάζει μετά την ακτινοβολία, αφού τόσο πριν, όσο και μετά την έκθεση σε UV, η τροποποίηση αυτή εντοπίζεται στις ίδιες περιοχές. Ωστόσο, η ένταση του σήματος για την H3K79me2 φαίνεται ελαφρώς μικρότερη στα ακτινοβολημένα κύτταρα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα (Εικόνα 28a, b). Δεδομένης της εξάρτησης του σήματος H3K79me2 από τον ρυθμό της μεταγραφής (Jonkers et al. 2014; Veloso et al. 2014), τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τον μικρότερο ρυθμό μεταγραφικής προώθησης που εμφανίζουν τα κύτταρα μετά την έκθεση σε UV (Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017).



Εικόνα 27. Ανοσοσύτρωμα κατά Western του κλάσματος ιστονών VH10 κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν ή όχι με UV ακτινοβολία (15J/m²). Τα ακτινοβολημένα κύτταρα συλλέχθηκαν στα αναγραφόμενα χρονικά σημεία (h) μετά την ακτινοβολία. **α. (Επάνω) Ανοσοσύτρωμα κατά Western που αφορά την μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K27ac.** Η ιστόνη 4 (H4) χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 3 διαφορετικών πειραμάτων. **(Κάτω) Ποσοτικοποίηση του α.** Οι τιμές ποσοτικοποίησης εκφράστηκαν ως συνάρτηση του σήματος των μη ακτινοβολημένων κυττάρων (NO UV). Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M). Το στατιστικό τεστ

ordinary One-way ANOVA Dunnett's multiple comparisons έδειξε μη στατιστικώς σημαντικές (non significant, n.s) διαφορές μεταξύ NO UV και +UV δειγμάτων. **b. Όπως στο a αλλά για την τροποποίηση H3K27me3.**

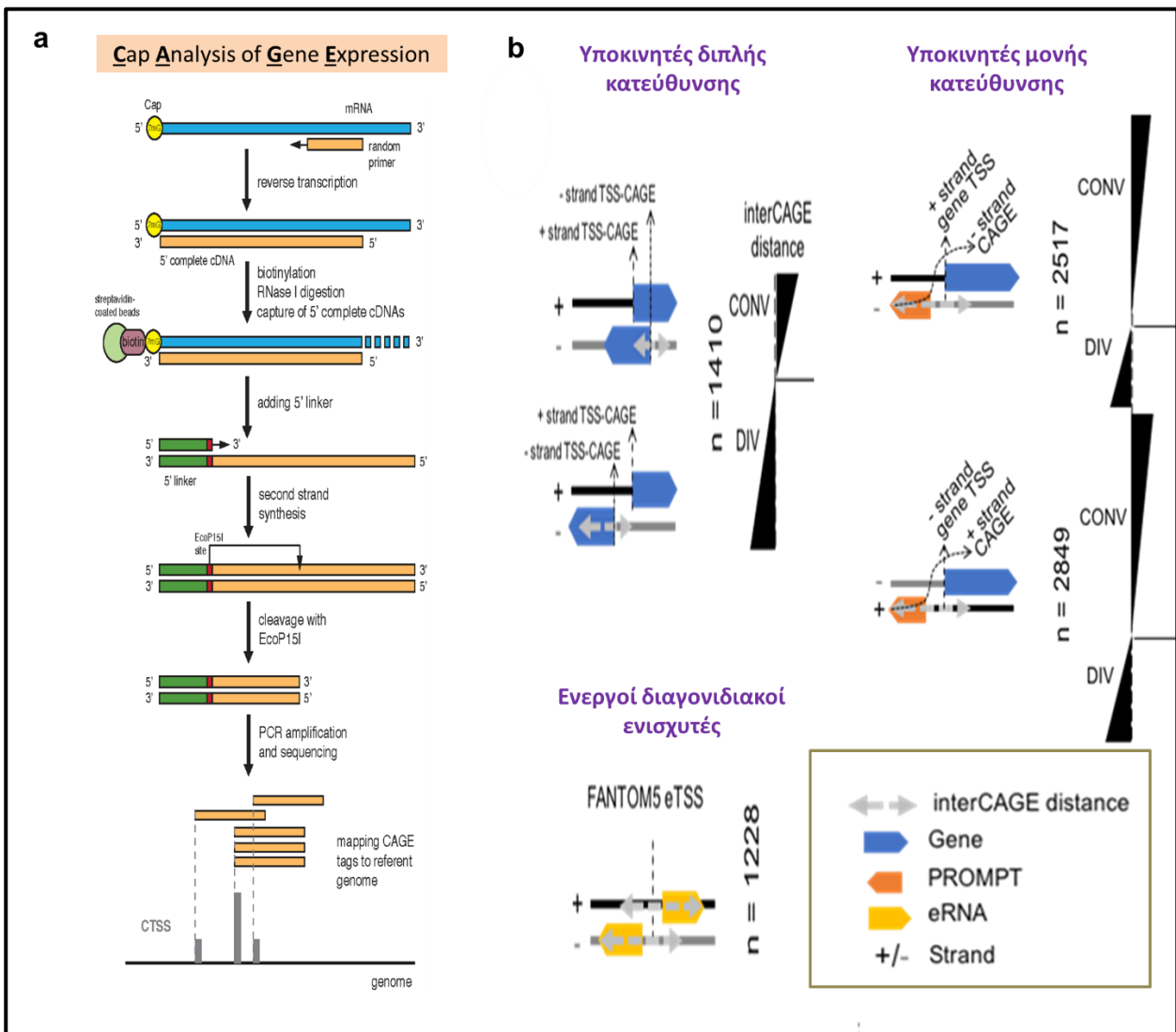


Εικόνα 28. a. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει την ένταση του ChIP-seq σήματος για την μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K79me2 σε μη ακτινοβολημένους (NO UV) και ακτινοβολημένους (+UV, 2 h, 20J/m²) Vh10-htert ινοβλάστες δέρματος. Στο διάγραμμα αποτυπώνονται οι γονιδιωματικές περιοχές 250 bp ανοδικά και 2 kb καθοδικά του TSS. **b.** Διάγραμμα απεικόνισης προφίλ μέσω τιμών του a, για τις ομάδες γονιδίων που εμφανίζουν πρόσδεση H3K79me2. Με μπλε απεικονίζεται το H3K79me2 ChIP-seq σήμα πριν την ακτινοβολήση, ενώ με ροζ το σήμα μετά την ακτινοβολήση με UV.

5.4 Μετάβαση της Pol II στη φάση επιμήκυνσης σε όλους τους μεταγραφόμενους γονιδιωματικούς τόπους

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τυχόν λειτουργικές προεκτάσεις της αύξησης της προσβασιμότητας της χρωματίνης μετά την έκθεση σε UV, πραγματοποιήσαμε μια συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων μας σε σχέση με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα (ChIP-seq Pol II-ser2P από Lavigne et al. 2017 και Cap Analysis Gene Expression (CAGE) – seq (Εικόνα 29a) δεδομένα από Andersson et al. 2014a). Λαμβάνοντας υπ’ όψιν την κατεύθυνση της μεταγραφής (μεταγραφόμενη αλυσίδα του γονιδίου στον + (Watson) ή – (Crick) κλώνο του DNA, προσαρμόσαμε την λειτουργική ομαδοποίηση του γονιδιώματος με σκοπό να προσδιοριστούν τα TSS των mRNAs, των PROMPTs και των eRNAs, και συγκεκριμένα εκείνα τα οποία δεν αλληλοεπικαλύπτονται με μεταγραφόμενες γονιδιωματικές περιοχές γειτονικών/αλληλοεπικαλυπτόμενων γονιδίων, υποκινητών ή ενισχυτών (Βλέπε Μεθόδους). Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τρεις κατηγορίες (Εικόνα 29b) σύμφωνα με προηγούμενα μοντέλα (Chen et

al. 2016). Στην πρώτη κατηγορία, ορίσαμε τις γονιδιωματικές περιοχές που κωδικοποιούν ζεύγη mRNA-mRNA που μεταγράφονται σε αντίθετες κατευθύνσεις, στις οποίες μπορούμε να ανιχνεύσουμε CHIP-seq σήματα των Pol II-ser2P και H3K27ac, ως ενεργούς υποκινητές διπλής κατεύθυνσης (active bidirectional promoters). Η δεύτερη κατηγορία, αποτελείται από τους υποκινητές μονής κατεύθυνσης (active unidirectional promoters) οι οποίοι κωδικοποιούν ένα mRNA στον ένα κλώνο (+ ή -) για το οποίο μπορούμε να αντιστοιχίσουμε ένα PROMPT στον αντισηματικό κλώνο (antisense strand). Η τρίτη κατηγορία περιέχει τους ενεργούς διαγονιδιακούς ενισχυτές (active intergenic enhancers), οι οποίοι επιλέχθηκαν με σκοπό την αποφυγή τυχόν παρεμβολών που προέρχονται από αλληλεπικαλυπτόμενη μεταγραφή άλλων ενεργών στοιχείων.

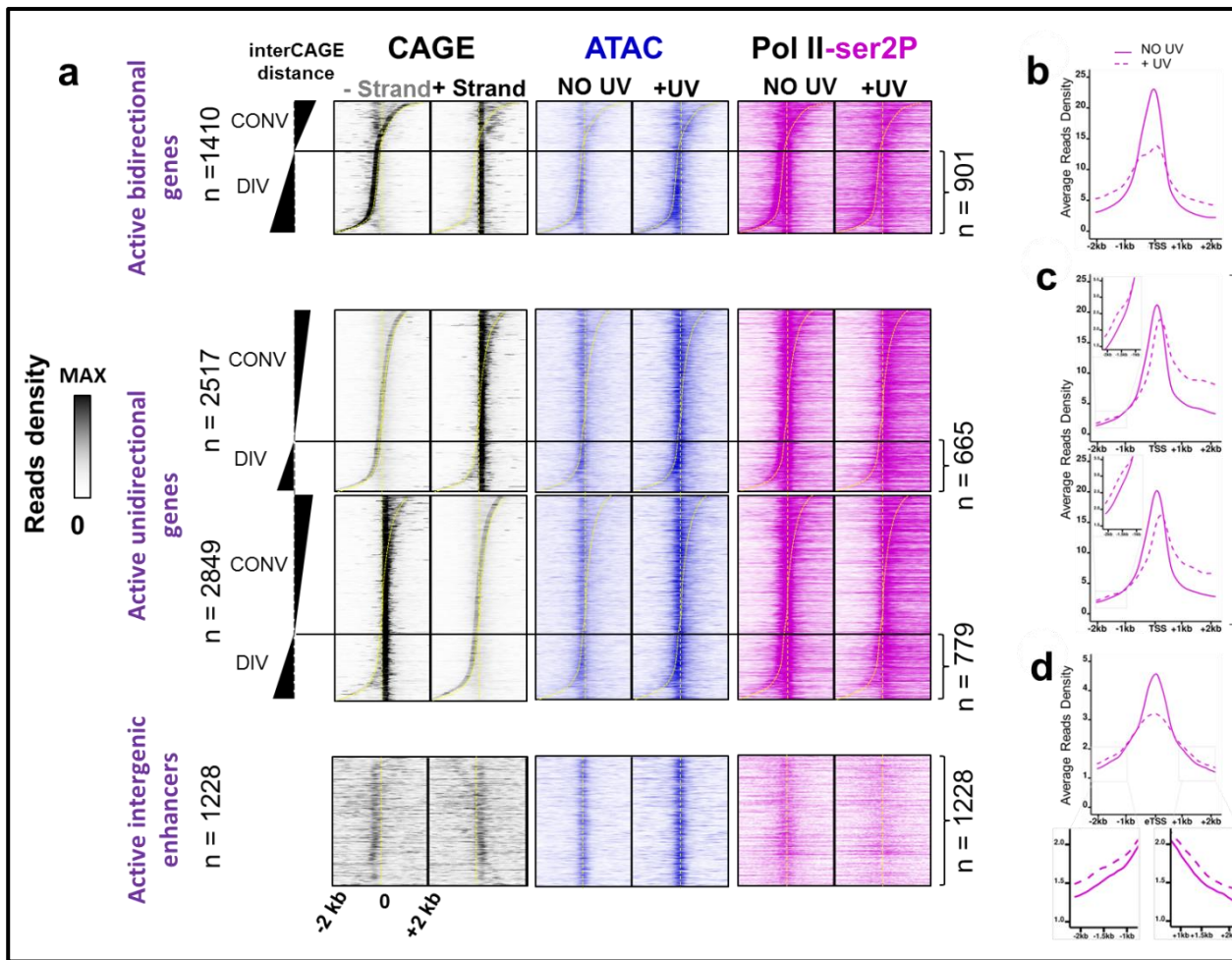


Εικόνα 29. Λειτουργική ομαδοποίηση του γονιδιώματος με βάση τα CAGE-seq δεδομένα. α. Μεθοδολογία CAGE. Αρχικά, τα RNAs υπόκεινται σε αντίστροφη μεταγραφή μέσω τυχαίων εκκινητών (random priming). Με τον τρόπο αυτό, μπορούν να στοχεύονται και τα RNAs που δεν έχουν την πολυαδενυλική ουρά (poly A tail). Στη συνέχεια το 5' κάλυμμα (cap) βιοτινυλιώνεται και τα βιοτινυλιωμένα RNAs συλλέγονται με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης (streptavidin beads). Έπειτα, το cDNA απελευθερώνεται από το RNA και ενώνεται με έναν 5' συνδέτη (linker) ο οποίος διαθέτει χαρακτηριστική αλληλουχία τα τύπου barcode καθώς και θέση περιορισμού EcoP15I. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του cDNA και πέψη με το ένζυμο EcoP15I το οποίο και κόβει 27 bp εσωτερικά του σημείου πρόσδεσης του συνδέτη. Στα 3' άκρα των θραυσμάτων

ενώνεται ένας 3' linker που περιέχει κατάλληλες αλληλουχίες για πρόσδεση των Illumina εκκινητών. Τέλος, τα CAGE κομμάτια DNA ενισχύονται μέσω PCR για να αλληλουχηθούν. **b. Κατηγορίες ομαδοποίησης γονιδιώματος.** Στην εικόνα οπτικοποιείται η κατεύθυνση των μεταγράφων και αναφέρεται ο αριθμός (n) των υποκινητών και ενισχυτών που εντοπίστηκαν σε κάθε κατηγορία. Η συγκεκριμένη ομαδοποίηση οδηγεί στη δημιουργία επικαλυπτόμενων (Convergent, CONV) και μη επικαλυπτόμενων (Divergent, DIV) ζευγών, για κάθε λειτουργική κατηγορία γονιδίων.

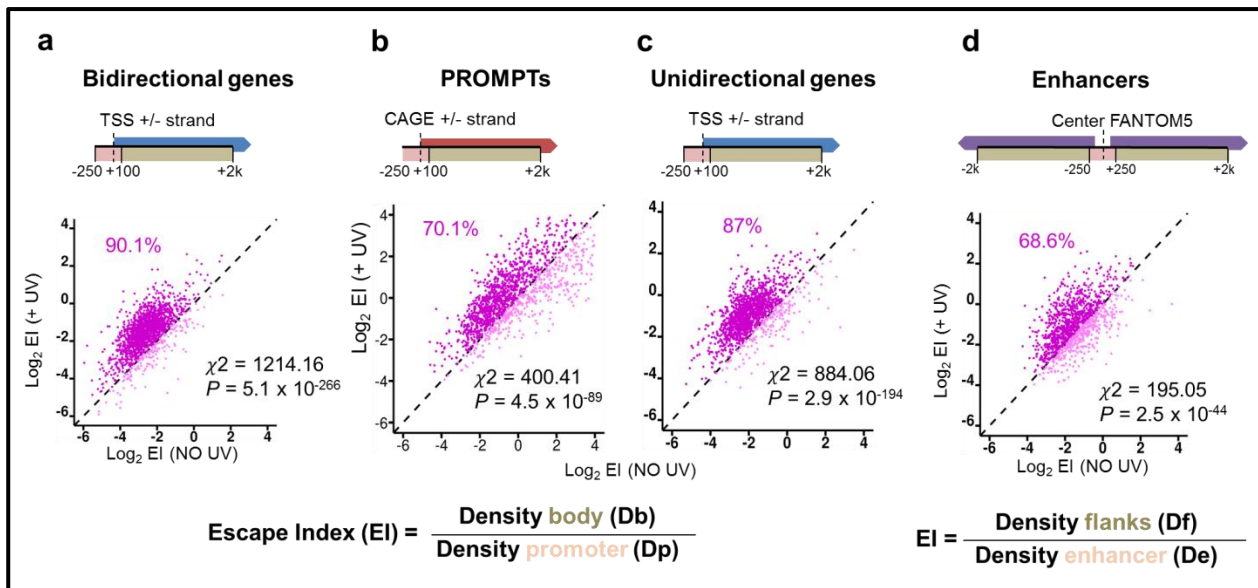
Αξίζει να σημειωθεί πως η ενεργότητα των PROMPTs και ενισχυτών καθορίστηκε από τα διαθέσιμα CAGE δεδομένα για ινοβλάστες δέρματος (Consortium FANTOM5, βλέπε μεθόδους) που προσδιορίζουν με ακρίβεια τη θέση έναρξης μεταγραφής (5' άκρο), την αφθονία και τη σχετική κατεύθυνση της μεταγραφής. Οι θέσεις TSS, των διαφόρων ζευγών μεταγράφων της κάθε ομάδας, ταξινομήθηκαν με βάση την μεταξύ τους CAGE απόσταση, η οποία ορίστηκε ως η απόσταση που διαχωρίζει τις κορυφές των σημάτων CAGE που ανιχνεύονται στους κλώνους (+) και (-) (βλέπε Μέθοδοι). Αυτό μας επέτρεψε να εντοπίσουμε περιοχές με αλληλοεπικαλυπτόμενη (convergent) ή μη αλληλοεπικαλυπτόμενη (divergent) μεταγραφή. Εστιαζόμενοι στην μη αλληλοεπικαλυπτόμενη μεταγραφή, μπορέσαμε να μελετήσουμε τη δυναμική της μεταγραφής στις δύο κατευθύνσεις, χωρίς παρεμβολές από οποιαδήποτε κατεύθυνση.

Στη συνέχεια παρατηρήσαμε πως η γενικευμένη αύξηση στην προσβασιμότητα της χρωματίνης στις ρυθμιστικές περιοχές, ήταν σε αντιστοιχία με την προώθηση της Pol II στη φάση της επιμήκυνσης, όχι μόνο σε γονίδια που κωδικοποιούν mRNA αλλά και στα PROMPTs και στους ενισχυτές (Εικόνα 30), όπως φαίνεται από την μείωση του σήματος της Pol II στα αντίστοιχα TSS και την αύξηση του σήματος σε περιοχές καθοδικά των TSS.



Εικόνα 30. Μετάβαση της Pol II στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης σε όλους τους μεταγραφόμενους γονιδιωματικούς τύπους. **a.** Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει το σήμα CAGE (μαύρο χρώμα, σε – και + κλώνους) σε σταθερές συνθήκες καθώς και το σήμα ATAC-seq (μπλε χρώμα) και ChIP-seq Pol II-ser2P πριν (NO UV) και μετά την ακτινοβόληση με UV. Το διάγραμμα αναφέρεται στις γονιδιωματικές περιοχές 2kb εκατέρωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής, όπως αυτό καθορίζεται από το CAGE-seq στον + κλώνο. Οι γονιδιωματικοί τύποι ταξινομήθηκαν κατά φθίνουσα CAGE απόσταση (“+ TSS-CAGE” - “-TSS CAGE”). Τα μη επικαλυπτόμενα ζεύγη (Divergent, DIV) αντιστοιχούν σε CAGE απόσταση > 100 bp. **b.** Διάγραμμα απεικόνισης προφίλ μέσω τιμών του ChIP-seq Pol II-ser2P σήματος στα ενεργά γονίδια διπλής κατεύθυνσης (active bidirectional genes), σε μη ακτινοβολημένα (NO UV, συνεχής γραμμή) και ακτινοβολημένα (+UV, διακεκομμένη γραμμή) κύτταρα. Το γράφημα απεικονίζει τις γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS. **c.** Όπως στο **b** αλλά για τα ενεργά γονίδια μονής κατεύθυνσης (active unidirectional genes). **d.** Όπως στο **b** αλλά για τους ενεργούς διαγονιδιακούς ενισχυτές (active intergenic enhancers).

Επιπλέον, επιβεβαιώσαμε ποσοτικά τα αποτελέσματά μας μέσω του υπολογισμού του δείκτη διαφυγής (Escape Index, EI, βλέπε Κεφάλαιο 4.11) που είναι αντίστροφος του δείκτη παύσης (Pausing Index, (Williams et al. 2015)), ο οποίος αυξήθηκε στα ακτινοβολημένα κύτταρα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα για το 90,1% των υποκινητών διπλής κατεύθυνσης (Εικόνα 31a, Chi-square test $P = 5.1 \times 10^{-266}$), καθώς επίσης και για το 70,1% των PROMPTs (Εικόνα 31b-c, Chi-square test $P = 4.5 \times 10^{-89}$) και 68,6% eRNAs (Εικόνα 31d, Chi-square test $P = 2.5 \times 10^{-44}$).



Εικόνα 31. a-d. Σύγκριση του δείκτη διαφυγής (Escape Index, EI) πριν και μετά την ακτινοβόληση με UV, στις αναφερόμενες κατηγορίες γονιδίων. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρεται το ποσοστό των γενετικών τόπων που παρουσιάζει αύξηση στον δείκτη EI μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία.

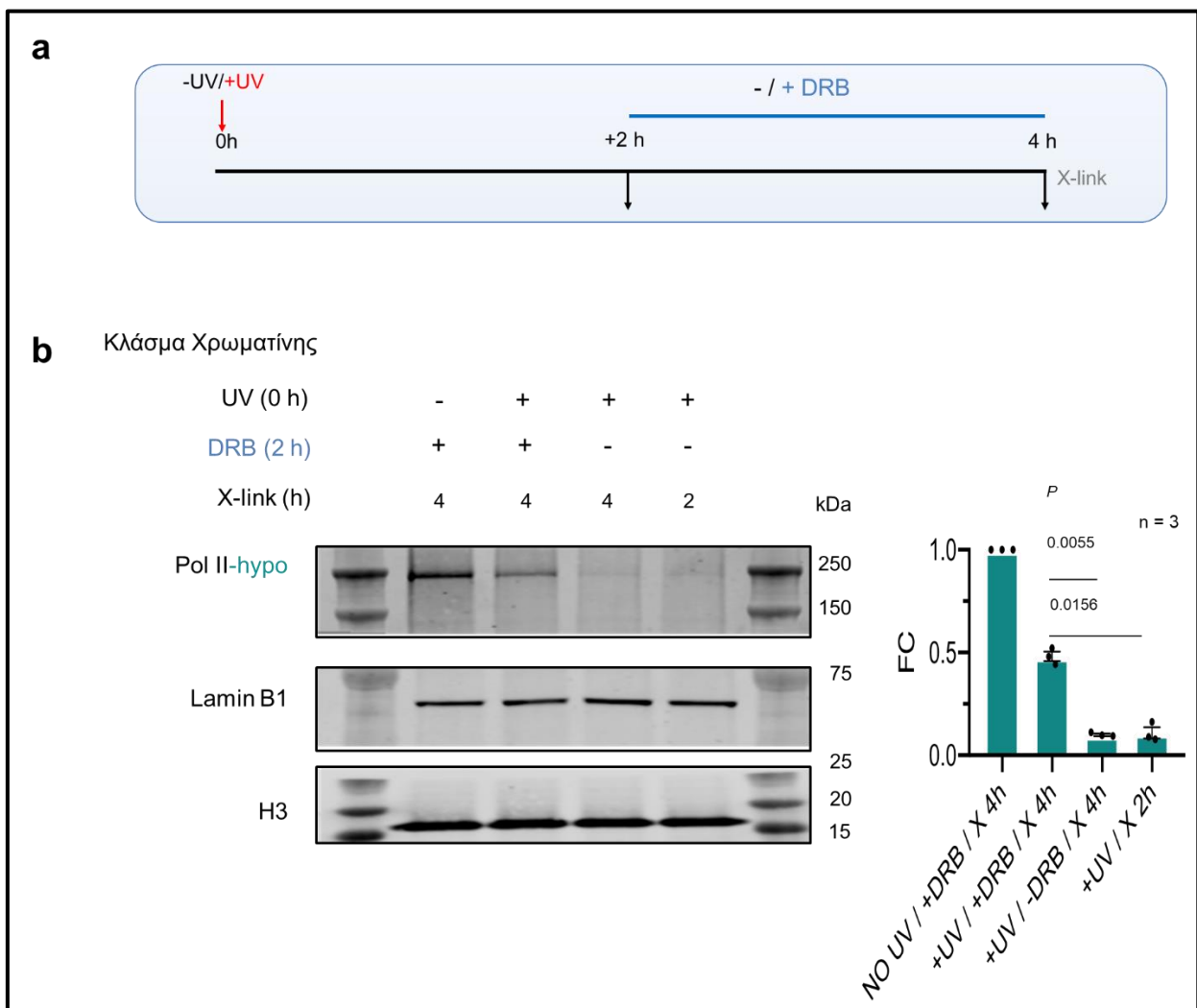
Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η απελευθέρωση της Pol II από τις PPP θέσεις ως απόκριση στο γενετοξικό στρες της UV ακτινοβολίας, ενεργοποιείται συγχρόνως σε διαφορετικούς τύπους ενεργών μονάδων μεταγραφής, διευρύνοντας έτσι τον μηχανισμό επιτήρησης του γονιδιώματος (Lavigne et al. 2017) ουσιαστικά σε όλες τις μεταγραφόμενες ρυθμιστικές περιοχές.

5.5 Αναστολή της μεταγραφικής επιμήκυνσης με DRB, επαναφέρει τα επίπεδα της Pol II-ηγο, μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία

5.5.1 Πειράματα μελέτης των δυναμικών της μεταγραφικής έναρξης ως απόκριση στη UV ακτινοβολία, σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος

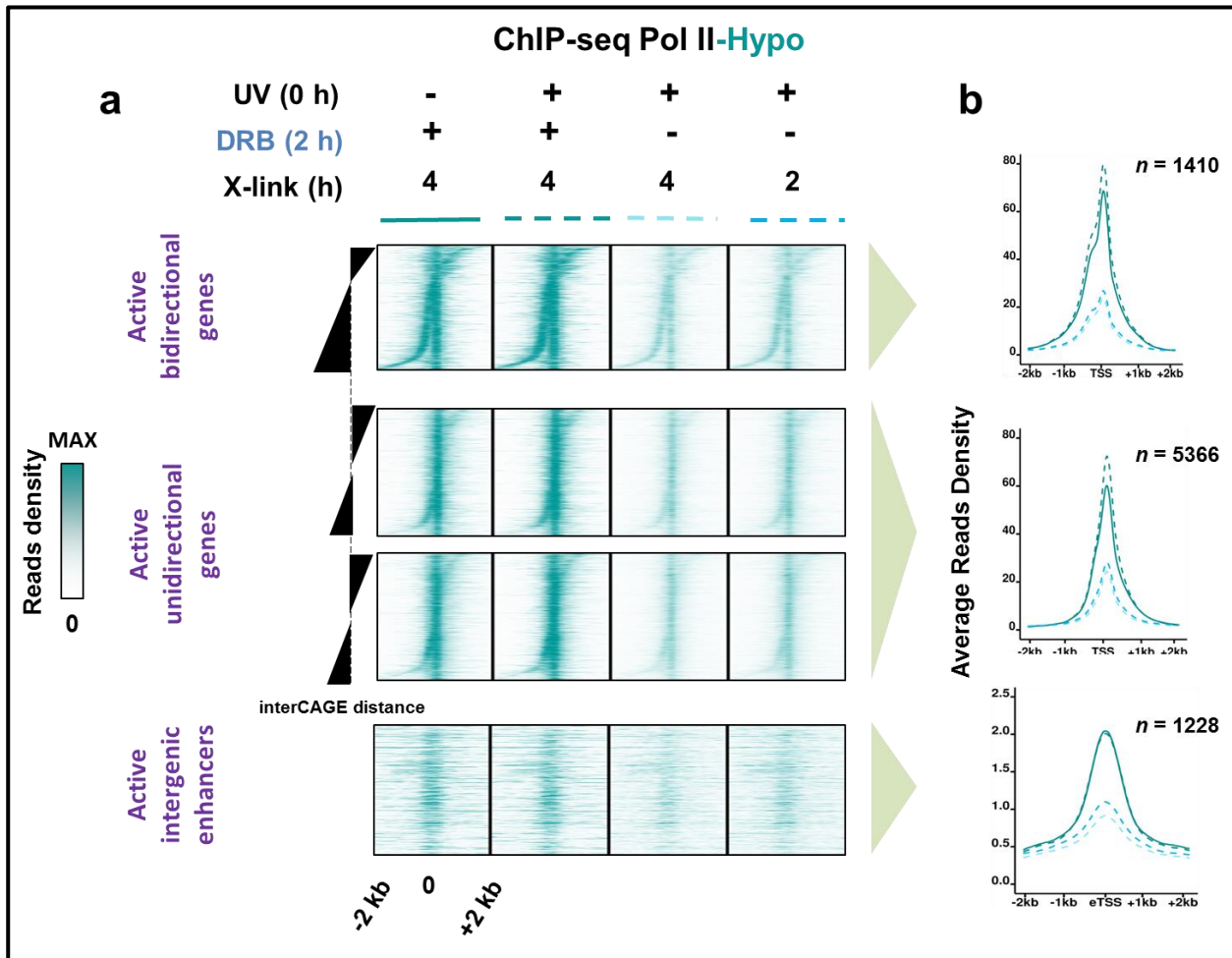
Συνδυαστικά οι παρατηρήσεις μας υποδεικνύουν ότι η μείωση του σήματος της Pol II-ηγο σε TSSs και eTSSs δεν οφείλεται σε αλλαγές στην προσβασιμότητα της χρωματίνης (Εικόνα 22) ή επιγενετικές αλλαγές (Εικόνες 25-27) στις TSS περιοχές, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν γενικευμένη αναστολή της έναρξης της μεταγραφής μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Με σκοπό να εξετάσουμε περαιτέρω την υπόθεση μας αυτή, πραγματοποιήσαμε ένα σύνολο πειραμάτων με σκοπό να προσδιορίσουμε αν η Pol II-ηγο στρατολογείται στα διάφορα TSSs μετά από έκθεση σε UV. Αρχικά, ακολουθώντας το πειραματικό χρονοδιάγραμμα που απεικονίζεται στην Εικόνα 32a, τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν (ή όχι) ($15\text{J}/\text{m}^2$) και στη συνέχεια αυτά επώαστηκαν για διάστημα 2 ωρών, χρονικό σημείο όπου έχει διαπιστωθεί πως τα επίπεδα της Pol II ηγο εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα. Έπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία (ή όχι) του αναστολέα της μεταγραφικής επιμήκυνσης, DRB, για διάστημα 2 ωρών, όπου και υπέστησαν διασύνδεση με φορμαλδεΐδη (crosslinking).

Σε κύτταρα που δεν επώαστηκαν σε DRB και υπέστησαν διασύνδεση 2 ώρες μετά την ακτινοβολία (+ UV / X 2 h) ή κύτταρα που επώαστηκαν σε DMSO για 2 ώρες μετά την αρχική περίοδο ανάρρωσης και στη συνέχεια υπέστησαν διασύνδεση (+ UV / -DRB / X 4 h), ανιχνεύθηκαν μειωμένα επίπεδα Pol II-hyπο σε εκχυλίσματα χρωματίνης μέσω της μεθόδου Western Blot (Εικόνα 32b). Αντίθετα, όταν ακτινοβολημένα κύτταρα επώαστηκαν σε θεραπευτικό υλικό που περιείχε DRB μετά από την αρχική περίοδο (2 ώρες) ανάκαμψης μετά την ακτινοβολία (+UV / +DRB / X 4h), παρατηρήθηκε μια σημαντική επαναφορά των επιπέδων της Pol II-hyπο σε εκχυλίσματα χρωματίνης (Εικόνα 32b, two sided Student's t test P = 0.0055 σε σχέση με το "+UV/-DRB/X 4h" και P = 0.0156 συγκριτικά με την πειραματική συνθήκη "+UV/X 2h").



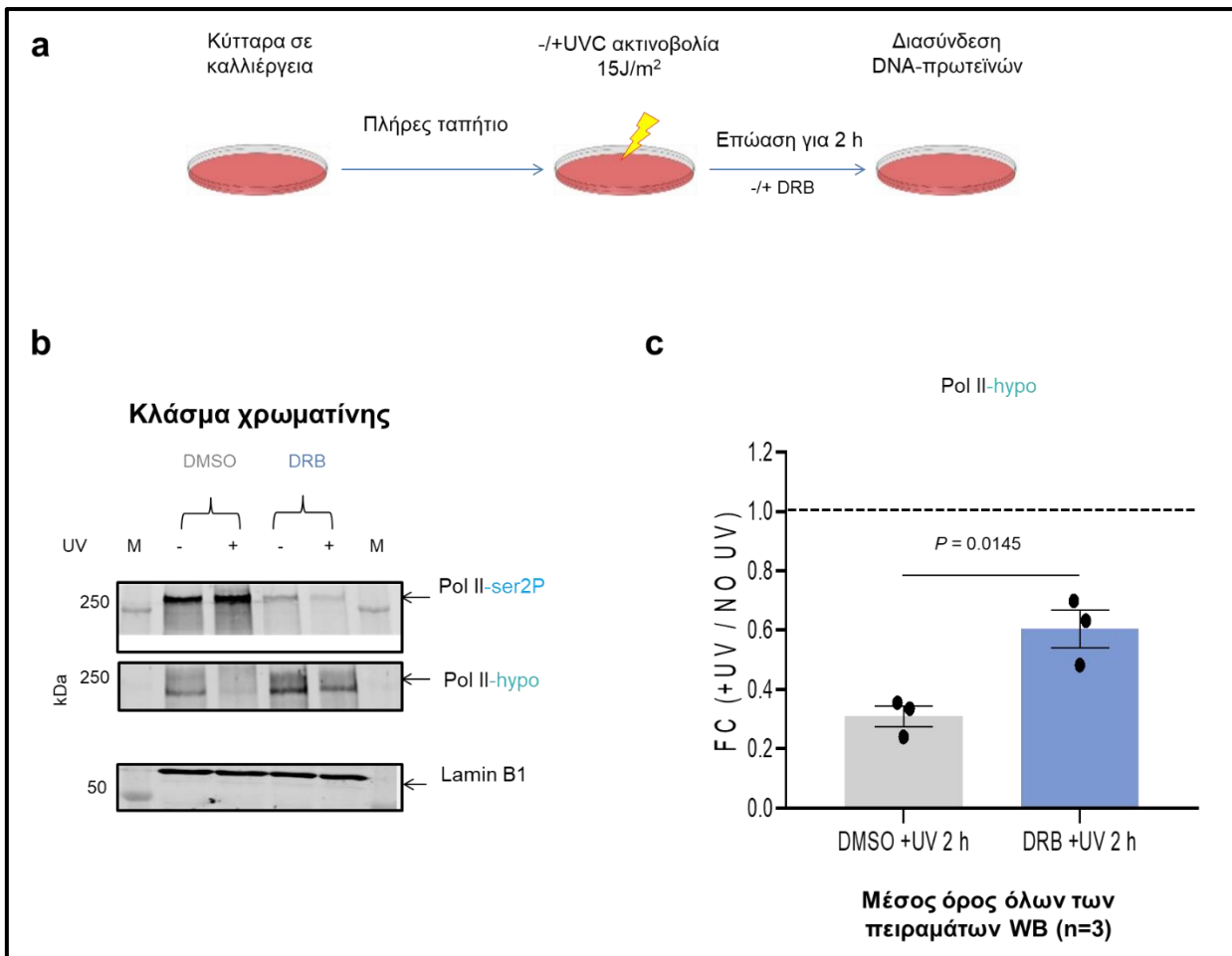
Εικόνα 32. a. Πειραματικό χρονοδιάγραμμα 1. Η δόση ακτινοβολίας στην οποία εκτέθηκαν τα κύτταρα ήταν $15\text{J}/\text{m}^2$, ενώ ο αναστολέας DRB χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση $100\mu\text{M}$. **b. (Αριστερά) Ανοσοσύτρωμα κατά Western του κλάσματος χρωματίνης που αφορά την Pol II-hyπο στις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στο a.** Οι πρωτεΐνες Lamin B1 και H3 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 3 διαφορετικών πειραμάτων. (Δεξιά) Ποσοτικοποίηση του b. Το σήμα εκφράστηκε σε σχέση με το σήμα στην πειραματική συνθήκη NO UV/+DRB/X 4h. Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M), ενώ αναγράφεται και η τιμή σημαντικότητας (p value) που προέκυψε από την στατιστική διαδικασία Student's test.

Στο ίδιο πλαίσιο και για να μελετηθεί το γονιδιωματικό πρότυπο πρόσδεσης της Pol II-hygro, πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα έναντι της Pol II-hygro στις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην Εικόνα 32a. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως στα ενεργά TSSs, PROMPTs και eTSSs, η μέση πυκνότητα του σήματος για την Pol II-hygro σε ακτινοβολημένα κύτταρα μετά την δράση του DRB (+ UV / + DRB/ X 4h) είναι αντίστοιχα με τα επίπεδα των μη ακτινοβολημένων κυττάρων (NO UV / + DRB / X 4h) (Εικόνα 33a, b).



Εικόνα 33. a. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει το ChIP-seq Pol II-hygro σήμα στις γονιδιωματικές περιοχές 2kb εκατέρωθεν του TSS των ενεργών γονιδίων διπλής κατεύθυνσης (active bidirectional genes) και ενεργών γονιδίων μονής κατεύθυνσης (active unidirectional genes), καθώς και ενεργών διαγονιδιακών ενισχυτών, στις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην Εικόνα 32a. Οι γονιδιωματικοί τόποι ταξινομήθηκαν κατά φθίνουσα CAGE απόσταση (“+ TSS-CAGE” - “-TSS CAGE”). **b.** Διάγραμμα απεικόνισης προφίλ μέσω τιμών του ChIP-seq Pol II-hygro σήματος για τις γονιδιωματικές κατηγορίες του a.

Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικά πειράματα στα οποία τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν και αφέθηκαν να ανακάμψουν παρουσία ή απουσία του DRB (Εικόνα 34a, Πειραματικό χρονοδιάγραμμα 2). Η ανάλυση πειραμάτων Western έδειξε πως επώαση με DRB για 2 ώρες μετά την ακτινοβολήση με UV περιορίζει την απώλεια της Pol II-hygro (δοκιμασία Student's t test $P = 0.0145$), σε εκχυλίσματα χρωματίνης (Εικόνα 34b, c).

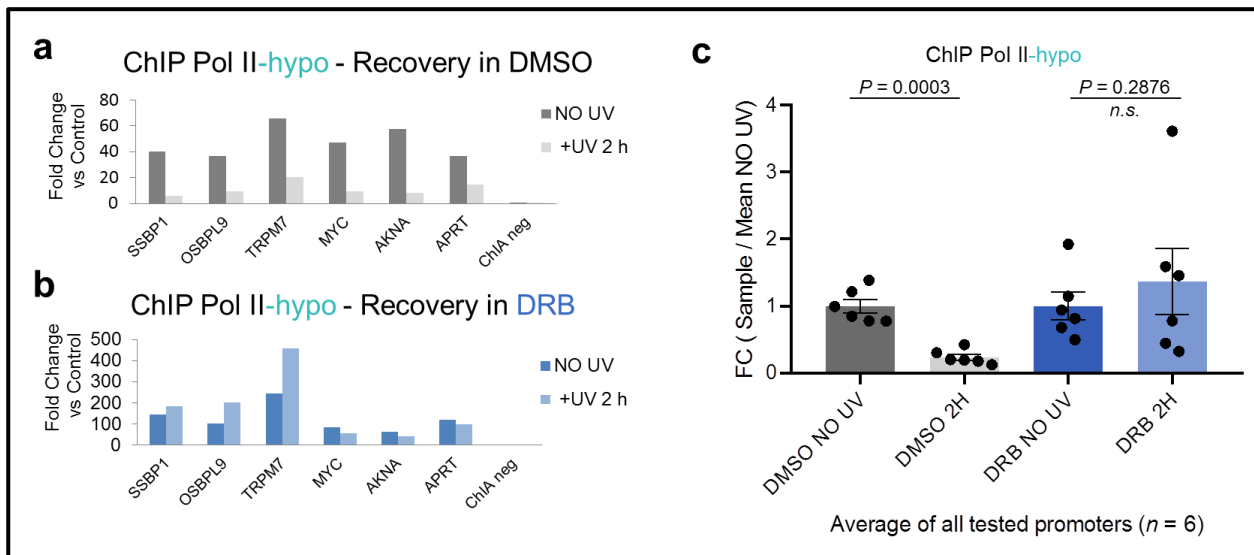


Εικόνα 34. α. Πειραματικό χρονοδιάγραμμα 2. Τα κύτταρα προ-επώαστηκαν με DRB (100μM τελική συγκέντρωση) για 10 λεπτά πριν την έκθεσή τους (ή όχι) στην υπεριώδη ακτινοβολία. Στην συνέχεια επώαστηκαν για 2 ώρες παρουσία ή όχι του DRB και υπέστησαν διασύνδεση με φορμαλδεΰδη. **β. Ανοσοσύτρωμα κατά Western του κλάσματος χρωματίνης Vh10 κυττάρων, που αφορά τις Pol II-ser2P και Pol II-hypo αντίστοιχα στις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στο α.** Η πρωτεΐνη Lamin B1 χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 3 διαφορετικών πειραμάτων. **γ. Ποσοτικοποίηση του β για την Pol II-hypo.** Το σήμα της Pol II-hypo μετά την ακτινοβολία (+ UV 2 h) συγκρίνεται με το αντίστοιχο NO UV σήμα (διακεκομμένη γραμμή) για την κάθε πειραματική συνθήκη (DMSO/DRB). Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M), ενώ αναγράφεται και η τιμή σημαντικότητας (p value) που προέκυψε από την στατιστική διαδικασία Student's test.

Για να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, πραγματοποιήσαμε πειράματα CHIP έναντι της Pol II hypo (στα ίδια εκχυλίσματα χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκαν στο παραπάνω WB) και στη συνέχεια με qPCR στοχεύσαμε γονιδιωματικές περιοχές 6 γονιδίων που βρίσκονται είτε στους υποκινητές, είτε σε περιοχές που βρίσκονται κοντά στο TSS. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν (Εικόνα 35) πως η επαγόμενη από την UV μείωση του σήματος της Pol II-hypo σε περιοχές γονιδίων κοντά στο TSS, αναστέλλεται από το DRB (two sided Student's t test $P = 0.002$ για τις συνθήκες επώασης σε DMSO, ενώ $P = 0.3138$ (μη στατιστικώς σημαντικό, non-significant, ns) για τις συνθήκες επώασης σε DRB).

Με άλλα λόγια, αποτρέποντας την απελευθέρωση των μορίων της Pol II στη φάση της παραγωγικής επιμήκυνσης (αμέσως μετά την ακτινοβολία ή σε μεταγενέστερο στάδιο), παρατηρείται επανάκαμψη των επιπέδων της Pol II-hypo. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι υπάρχει *de novo*

πρόσδεση Pol II-ηγο μορίων στις γονιδιωματικές περιοχές των υποκινητών κατά τη διάρκεια της φάσης ανάκαμψης των κυττάρων μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η απελευθέρωση των μορίων της Pol II από τις θέσεις PPP μετά τη UV, επιταχύνει την μετάβαση της Pol II από την φάση έναρξης σε αυτήν της επιμήκυνσης πρακτικά σε όλα τα ενεργά TSS, PROMPTs και eTSS και εξηγεί, από μηχανιστική άποψη, τη μείωση του σήματος της Pol II-ηγο σε όλες τις ενεργές TSS περιοχές, μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία.



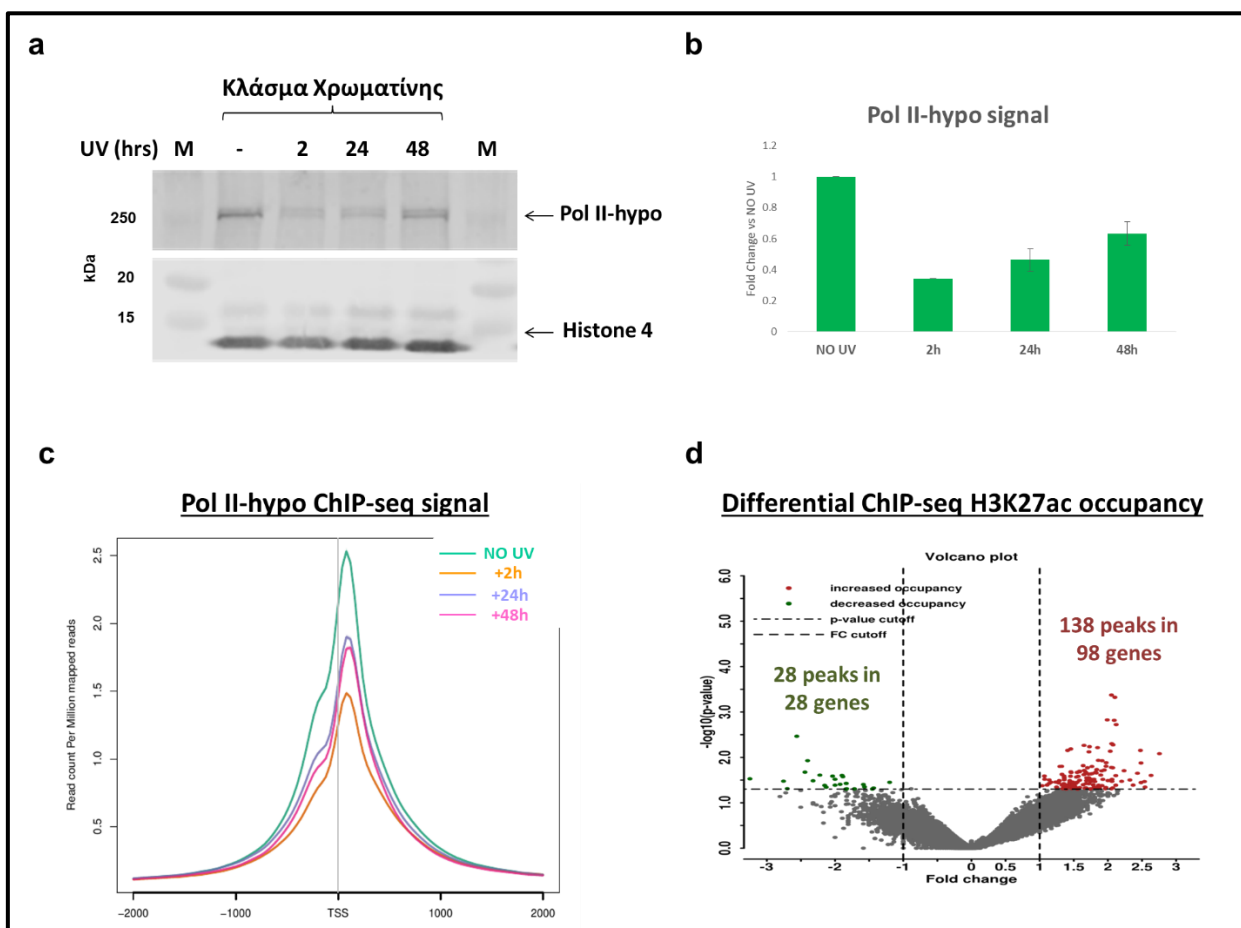
Εικόνα 35. Ανάλυση ChIP Pol II-ηγο-qPCR σε περιοχές TSS 6 γονιδίων, σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV) Vh10 κύτταρα, όταν αυτά επώαστηκαν για 2 ώρες με DMSO (a) και DRB (b) αντίστοιχα. Οι τιμές υπολογίστηκαν σε σχέση με έναν γενετικό τόπο όπου δεν παρατηρείται πρόσδεση Pol II-ηγο (ChIA neg). **c. Μέσος όρος του ChIP-qPCR σήματος για όλα τα γονίδια που ελέγχθηκαν.** Το σήμα υπολογίστηκε σε σχέση με το NO UV σήμα για τις συνθήκες επώασης σε DMSO και DRB, αντίστοιχα. Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M), ενώ αναγράφεται και η τιμή σημαντικότητας (p value) που προέκυψε από την στατιστική διαδικασία Student's test.

5.5.2 Πειράματα μελέτης των δυναμικών της μεταγραφικής έναρξης ως απόκριση στην UV ακτινοβολία, σε ινοβλάστες δέρματος CS-B

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα σε κύτταρα CS-B με σκοπό να αποσαφηνιστούν τα φαινόμενα που σχετίζονται με τις δυναμικές του σταδίου έναρξης της μεταγραφής μετά την έκθεση σε UV στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, καθώς είναι χαρακτηρισμένη η ανικανότητα των κυττάρων CS-B να επανεκκινήσουν την μεταγραφή μετά από έκθεση στην UV (Rockx et al. 2000; Proietti-De-Santis et al. 2006; Kristensen et al. 2013; Andrade-Lima et al. 2015; Eranchintsev et al. 2017).

Πράγματι, πειράματα Western Blot του κλάσματος χρωματίνης των CS-B κυττάρων έδειξαν πως η Pol II-ηγο μειώνεται σε διάστημα 2 ωρών (h) μετά την ακτινοβολία με UV ($15\text{J}/\text{m}^2$) (Εικόνα 36a, b). Για να εξεταστεί το πρότυπο κατανομής της Pol II-ηγο στα CS-B κύτταρα μετά την έκθεση σε UV, πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα έναντι της Pol II-ηγο σε μη ακτινοβολημένα και

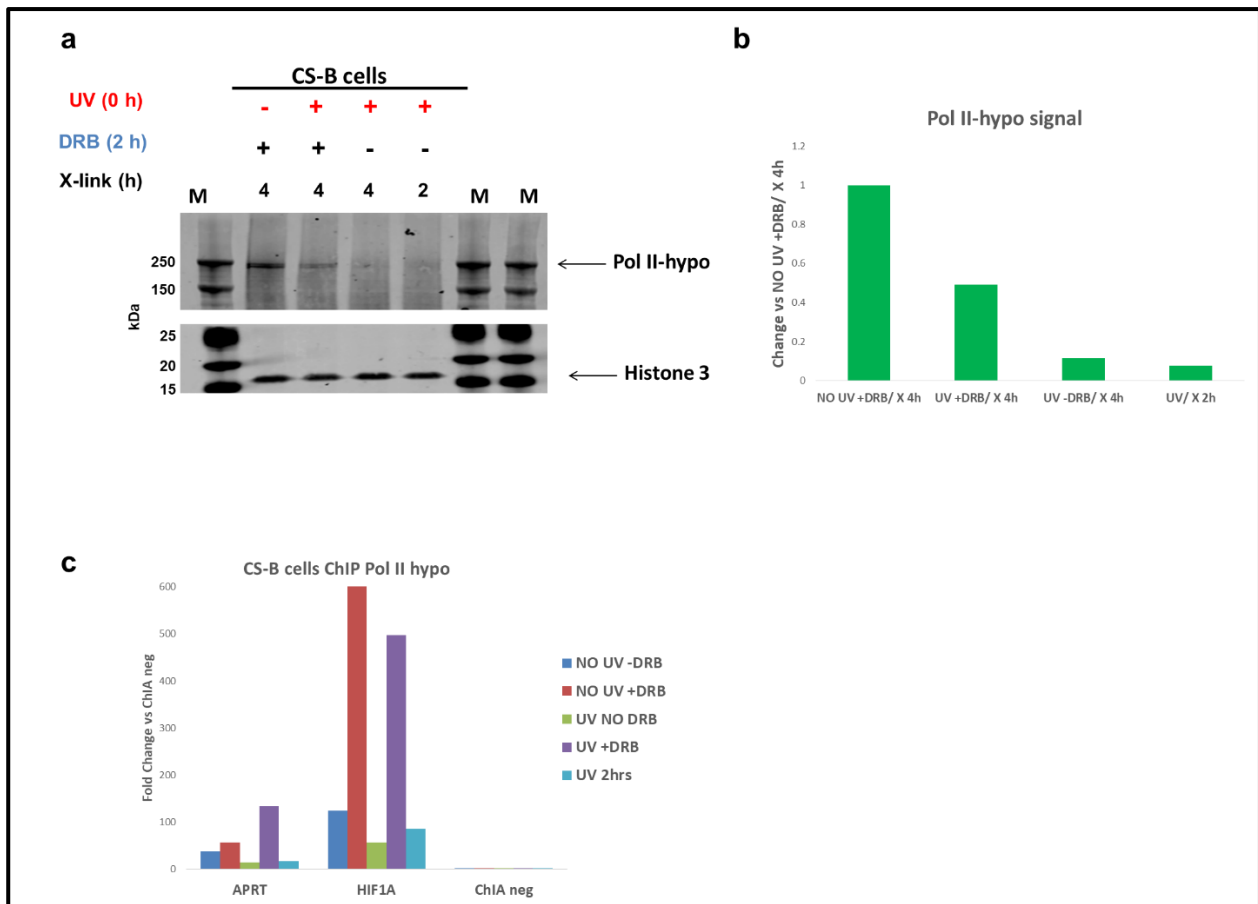
ακτινοβολημένα (2 h, 24 h, 48 h) κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το σήμα της Pol II-hypo μειώνεται στις TSS περιοχές των CS-B κυττάρων 2 ώρες μετά την έκθεση σε UV, ενώ εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα 24 και 48 h μετά την ακτινοβολήση (Εικόνα 36c). Για να αποσαφηνιστεί αν η ανωτέρω αλλαγές στα επίπεδα της Pol II-hypo στις περιοχές των υποκινητών συνοδεύονται με αντίστοιχη μείωση επιγενετικών τροποποιήσεων ιστονών που σχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση, πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα έναντι της H3K27ac, σε μη ακτινοβολημένους και ακτινοβολημένους (+ UV, 2 h, 15 J/m²) CS-B ινοβλάστες δέρματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εντοπισμός κορυφών (peaks) για την τροποποίηση H3K27ac και μέτρηση του αντίστοιχου σήματος στις περιοχές αυτές, με σκοπό την εύρεση περιοχών που παρουσιάζουν διαφορεική πρόσδεση της συγκεκριμένης μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Η συγκεκριμένη ανάλυση έδειξε πως από τις 86757 γονιδιωματικές περιοχές (peaks) H3K27ac που εντοπίστηκαν στις δύο πειραματικές συνθήκες, 138 φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση του H3K27ac μετά την έκθεση σε UV (FC >1, p value < 0.05), ενώ μόλις 28 περιοχές φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μείωση του H3K27ac σήματος (Εικόνα 36d).



Εικόνα 36. Ανοσοσύτρωμα κατά Western του κλάσματος χρωματίνης μη ακτινοβολημένων (-UV) και ακτινοβολημένων (15J/m²) CS-B κυττάρων, έναντι της Pol II-hypo. Η πρωτεΐνη Histone 4 χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου για ποσοτικοποίηση. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική 2 διαφορετικών πειραμάτων. **b.** Ποσοτικοποίηση του **a.** Οι τιμές εκφράστηκαν σε σχέση με την πειραματική συνθήκη NO UV. Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M). **c.**

Διάγραμμα απεικόνισης προφίλ μέσω των τιμών του ChIP-seq έναντι της Pol II-ηγρο, στα ενεργά γονίδια μη ακτινοβολημένων (NO UV) και ακτινοβολημένων (+2 h, +24 h, +48 h) CS-B κυττάρων. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές 2kb εκατέρωθεν του TSS. d. Διάγραμμα τύπου κρατήρα ηφαιστείου (volcano plot) που αναπαριστά τις περιοχές που εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές, ποσοτικές διαφορές στο ChIP-seq H3K27ac σήμα, μεταξύ ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων CS-B κυττάρων. Οι περιοχές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση του H3K27ac σήματος μετά την έκθεση σε UV, αναπαριστώνται με κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα.

Με άλλα λόγια, κατά 99.8% δεν παρατηρούνται διαφορές στην πρόσδεση της τροποποίησης H3K27ac, γεγονός που υποδεικνύει πως πιθανόν οι περιοχές που χαρακτηρίζονται από την παρουσία της τροποποίησης αυτής (ενεργοί υποκινητές και ενισχυτές) διατηρούν την ενεργότητά τους μετά την έκθεση σε UV στα CS-B κύτταρα. Τα δεδομένα αυτά ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν στα Vh10 κύτταρα (βλέπε παραπάνω, Εικόνες 18, 19, 25), δείχνοντας πως πιθανότατα το κομμάτι της μεταγραφικής αναδιοργάνωσης που αφορά την πρόσδεση της Pol II στις TSS περιοχές των γονιδίων μετά την έκθεση σε UV, αλλά και της αναδιοργάνωσης της χρωματίνης στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές, ελέγχεται με παρόμοιο τρόπο σε φυσιολογικά και CS-B κύτταρα. Για την αποσαφήνιση της ανωτέρω υπόθεσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 32a, σε CS-B ινοβλάστες δέρματος. Πειράματα Western Blot του κλάσματος χρωματίνης CS-B κυττάρων, έδειξαν πως η επώαση με DRB αναστέλλει σε μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από UV μείωση της Pol II-ηγρο (Εικόνα 37a, b). Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν ChIP-qPCR πειράματα έναντι της Pol II-ηγρο στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, στοχεύοντας υποκινητές 2 γονιδίων, με σκοπό την ποσοτικοποίηση του Pol II-ηγρο σήματος στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές.

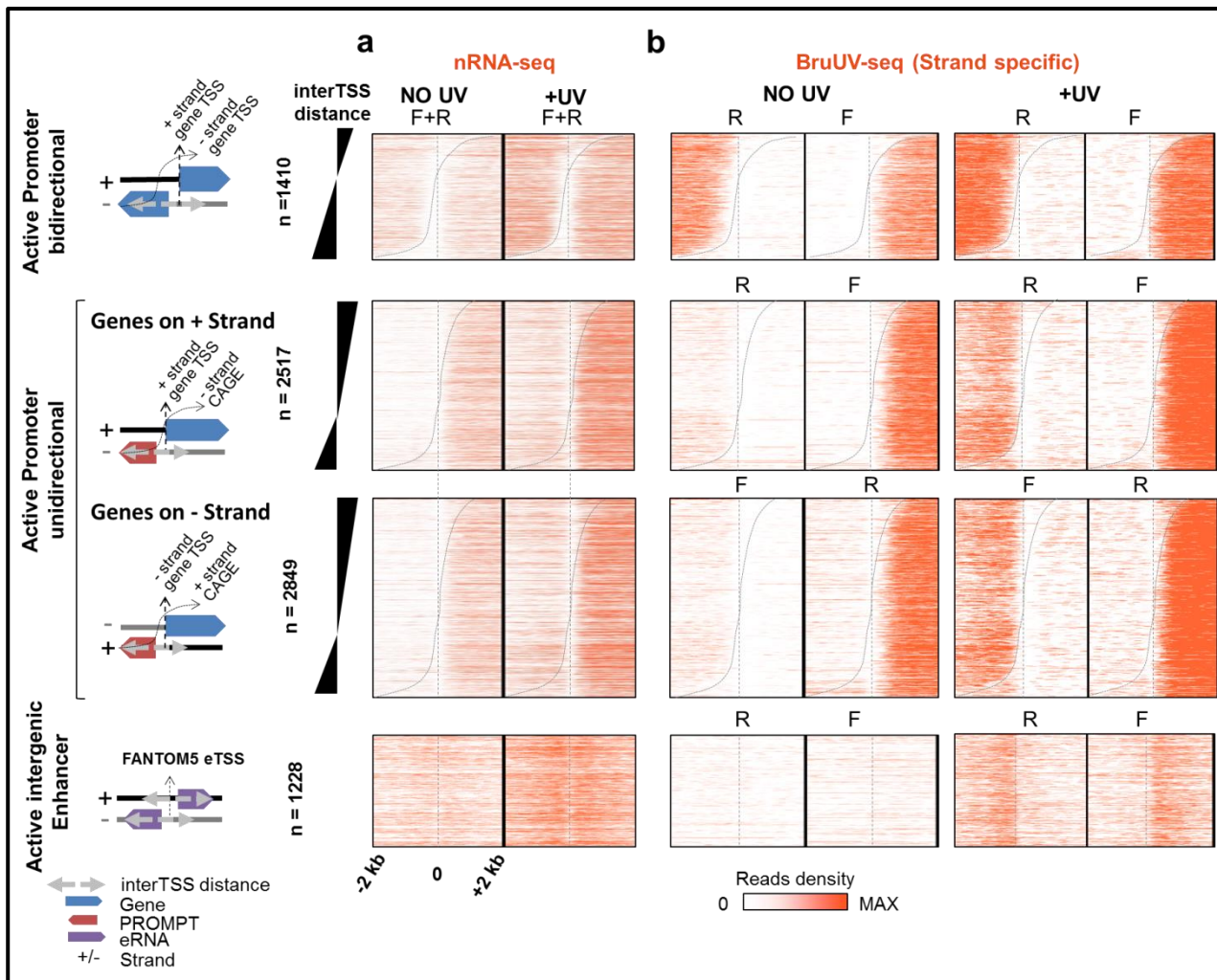


Εικόνα 37. α. Ανοσοσύτρωμα κατά Western που αφορά την Pol II-ηγο, χρησιμοποιώντας το κλάσμα χρωματίνης CS-B κυττάρων στα οποία εφαρμόστηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 32α. Η πρωτεΐνη Histone 3 χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση. **β.** Ποσοτικοποίηση του **α.** Οι τιμές εκφράστηκαν σε σχέση με την πειραματική συνθήκη NO UV +DRB/X 4h. **γ.** Ανάλυση ChIP Pol II-ηγο-qPCR για τις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων *APRT*, *HIF1A* σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV) CS-B κύτταρα, στα οποία εφαρμόστηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 32α. Οι τιμές υπολογίστηκαν σε σχέση με έναν γενετικό τόπο όπου δεν παρατηρείται πρόσδεση Pol II-ηγο (ChIA neg).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως επώαση με DRB αναστέλλει τη μείωση του σήματος της Pol II-ηγο, στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που μελετήθηκαν, μετά την έκθεση σε UV (Εικόνα 37c). Συνδυαστικά τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η μείωση της Pol II που παρατηρείται στα CS-B κύτταρα μετά από την επίδραση με UV, οφείλεται στη γρήγορη απελευθέρωση των Pol II μορίων από το στάδιο έναρξης, σε αυτό της παραγωγικής επιμήκυνσης. Ακόμη, τα πειράματά μας υποδεικνύουν πως στους ακτινοβολημένους CS-B ινοβλάστες (όπως και στους αντίστοιχους φυσιολογικούς (Vh10) ινοβλάστες), το στάδιο έναρξης της μεταγραφής δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο αυτό της επιμήκυνσης. Επιπλέον, φαίνεται πως η απουσία της CSB πρωτεΐνης, δεν εμποδίζει την δυνατότητα πρόσδεσης των Pol II μορίων στους υποκινητές μετά την UV, υπογραμμίζοντας τη σημασία της CSB στην επιδιόρθωση των βλαβών κατά το στάδιο της παραγωγικής επιμήκυνσης της μεταγραφής.

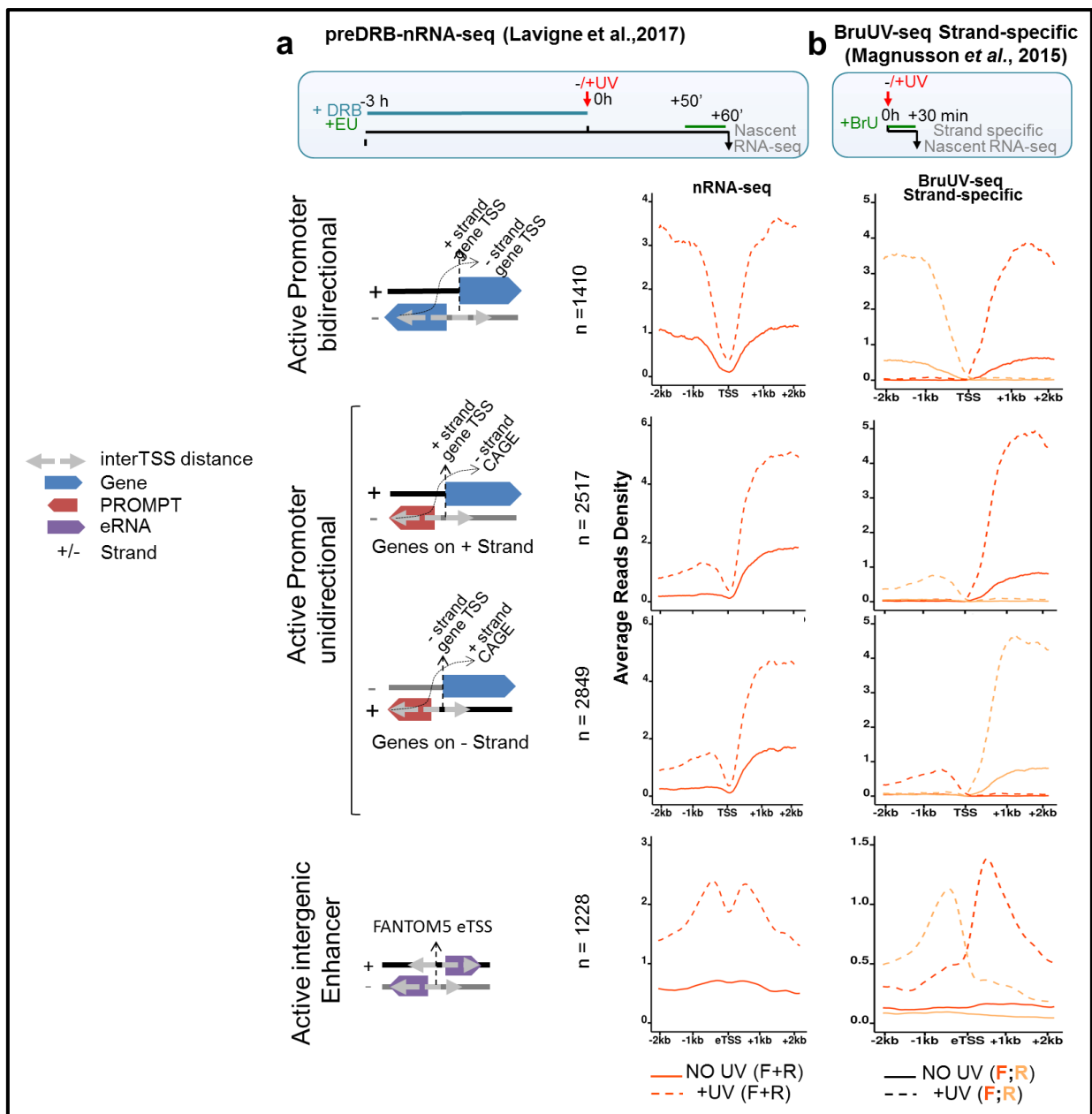
5.6 Αυξημένη σύνθεση νεοσυντιθέμενου RNA στα TSS των γονιδίων, των PROMPTs, και των eTSS μετά την έκθεση σε UV

Έχοντας δείξει πως η ακτινοβολία με UV δεν αναστέλλει τη στρατολόγηση της Pol II-ηγρο στους υποκινητές κωδικών και μη κωδικών μονάδων μεταγραφής (βλέπε Αποτελέσματα 4.5), θελήσαμε να εξετάσουμε την παρουσία νεοσυντιθέμενου RNA (nascent RNA, nRNA) στις αντίστοιχες θέσεις έναρξης της μεταγραφής, σε φυσιολογικούς (Vh10-htert) ινοβλάστες δέρματος. Αρχικά πραγματοποιήσαμε μετα-ανάλυση nRNA-seq δεδομένων (Magnuson et al. 2015; Lavigne et al. 2017) και επιβεβαιώσαμε την αύξηση των επιπέδων nRNA μορίων σημασμένων με EU ή Bru, μετά την έκθεση σε UV (Εικόνες 38, 39). Ειδικότερα, μέσω της καινούριας ομαδοποίησης του γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε, μπορέσαμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια την περιοχή του σήματος του nRNA και προς τις δύο κατευθύνσεις γύρω από το TSS των γονιδίων, PROMPTs και ενισχυτών και επιβεβαιώσαμε την αύξηση του σήματος του nRNA για τις διάφορες κατηγορίες. Για παράδειγμα, στους υποκινητές μονής κατεύθυνσης (unidirectional promoters) βρέθηκε πως μετά την UV παρατηρείται αύξηση του nRNA όχι μόνο στην κατεύθυνση του mRNA αλλά και στην αντινοηματική κατεύθυνση του PROMPT. Αντίστοιχα ευρήματα παρατηρήθηκαν και για τα επίπεδα του nRNA στις περιοχές των διαγονιδιακών ενισχυτών μετά την UV (Εικόνες 38, 39). Φαίνεται λοιπόν πως η συνεχής πρόσδεση Pol II-ηγρο μορίων στις περιοχές TSS των mRNA γονιδίων, PROMPTs και ενισχυτών κατά διάρκεια της ανάκαμψης μετά από έκθεση σε UV (Εικόνες 28-31), σε συνδυασμό με την γρήγορη προώθηση των Pol II μορίων στη φάση της επιμήκυνσης της μεταγραφής (Εικόνες 32-34), συμβάλλουν στον αυξημένο εντοπισμό nRNA στις παραπάνω κωδικές και μη κωδικές περιοχές.



Εικόνα 38. Αυξημένη σύνθεση nRNA στις TSS περιοχές γονιδίων και ενισχυτών μετά την UV ακτινοβολία. a. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει το nRNA-seq σήμα σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (UV, 1 h, 20J/m²) κύτταρα, στις γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS, για τις γονιδιωματικές κατηγορίες που περιγράφηκαν στην Εικόνα 29. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του nRNA-seq από την μελέτη Lavigne et al. 2017. F: σήμα στον + κλώνο του DNA, R: σήμα στον - κλώνο του DNA. **b.** Όμοια όπως στο **a** αλλά για δεδομένα από Magnuson et al. 2015, τα οποία παρέχουν την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ του σήματος BruUV-seq που αφορά τον + (F) και τον - (R) κλώνο του DNA.

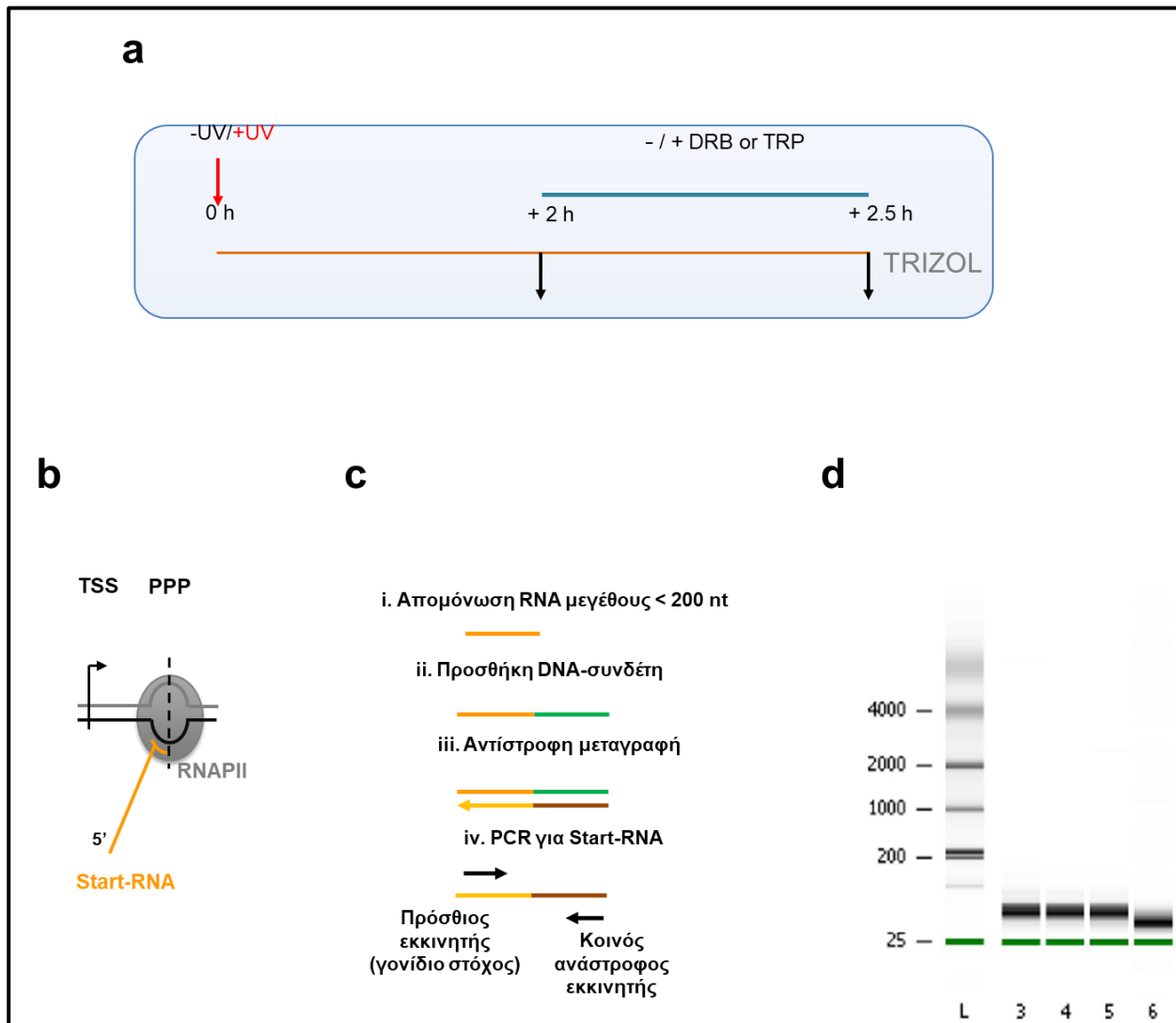
Για να επαληθεύσουμε περαιτέρω πως η έναρξη της μεταγραφής συνεχίζει ανεπηρέαστη μετά την UV ακτινοβολία στις περιοχές πλησίον των διαφόρων TSSs, επωφεληθήκαμε από την δυνατότητα εντοπισμού και μελέτης των start-RNAs, τα οποία μας πληροφορούν για την ποσότητα της Pol II που βρίσκεται στις αρχικές θέσεις της μεταγραφής (περίπου στα πρώτα 100 νουκλεοτίδια(Williams et al. 2015)).



Εικόνα 39. Διαγράμματα απεικόνισης προφίλ μέσω των τιμών του σήματος των πειραμάτων nRNA-seq (a) και BruUV-seq (b) πριν (NO UV) και μετά (+UV) την ακτινοβολία με UV. Σε πλαίσιο πάνω από τα διαγράμματα απεικονίζεται το πειραματικό χρονοδιάγραμμα (χημικά αντιδραστήρια, χρόνοι επώασης) που ακολουθήθηκε σε κάθε περίπτωση. Η εικόνα σχετίζεται με την Εικόνα 38.

Για τον σκοπό αυτό, ακολουθήσαμε την πειραματική διαδικασία που απεικονίζεται στην Εικόνα 40. Στη διαδικασία αυτή τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με UV, αφέθηκαν να ανακάμψουν για δύο ώρες μετά την ακτινοβολία και στη συνέχεια στο θρεπτικό τους υλικό προστέθηκαν (ή όχι) αναστολείς της επιμήκυνσης (DRB) ή της έναρξης (triptolide-TRP) της μεταγραφής. Για κάθε πειραματική συνθήκη απομονώθηκαν τα μικρού μεγέθους RNA (<200 νουκλεοτίδια, nt), και ένας κοινός RNA-DNA συνδέτης (linker) ενώθηκε με το 3' άκρο τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας έναν κοινό εκκινητή, συμπληρωματικό με την αλληλουχία του μορίου συνδέτη. Ακολούθως, αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν για την ποσοτική σύγκριση των επιπέδων

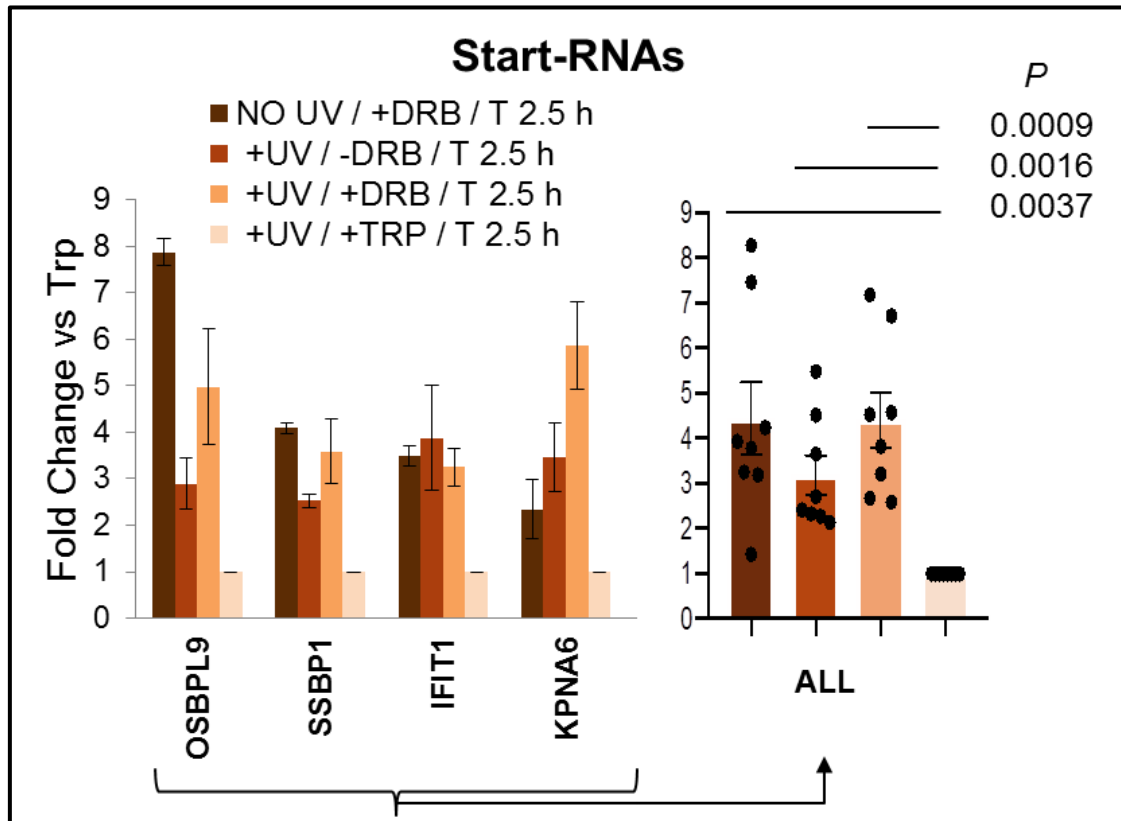
των start-RNAs σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές όπου είχε ανιχνευτεί Pol II-ser2P CHIP-seq ή nRNA-seq σήμα.



Εικόνα 40. Πειραματικό χρονοδιάγραμμα και διαδικασία απομόνωσης των start-RNAs. **a. Πειραματικό χρονοδιάγραμμα.** Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν (ή όχι) με UV (15 J/m^2) και στη συνέχεια αφήθηκαν να επανακάμψουν για 2 ώρες. Στη συνέχεια στο θρεπτικό τους υλικό προστέθηκαν, ανάλογα με την πειραματική συνθήκη, αναστολείς της επιμήκυνσης (DRB, τελική συγκέντρωση $100\mu\text{M}$), της έναρξης της μεταγραφής (TRP, τελική συγκέντρωση 125nM) ή DMSO(κύτταρα μάρτυρες). Μετά από μισή ώρα το κυτταρικό υλικό συλλέχθηκε σε Trizol. **b. Γραφική αναπαράσταση των start-RNAs στις θέσεις PPP.** **c. Πειραματική διαδικασία ποσοτικής μελέτης των start-RNAs μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία.** Μετά την απομόνωση των RNAs μεγέθους < 200 νουκλεοτιδίων (nt), στο 3' άκρο των μορίων προστέθηκε το μόριο του DNA συνδέτη (linker). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με εκκινητή συμπληρωματικό της αλληλουχίας του DNA linker. Στις qPCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν ένας πρόσθιος εκκινητής που στοχεύει την TSS περιοχή του κάθε γονιδίου στόχου και ένας κοινός ανάστροφος εκκινητής, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία του εκκινητή της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Βλέπε Μεθόδους, Κεφάλαιο 4.14 για λεπτομέρειες). **d. Απεικόνιση εικόνας του Agilent RNA 6000 Nano Bioanalyzer, που δείχνει την κατανομή μεγέθους RNA δειγμάτων, στα οποία απομονώθηκε το κλάσμα που περιέχει μόρια μεγέθους <200 nt.**

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως τα επίπεδα των start-RNAs μετά την UV βρίσκονταν σε αντίστοιχα επίπεδα με αυτά των μη ακτινοβολημένων κυττάρων (Εικόνα 41). Αναλυτικότερα, η αναστολή της απελευθέρωσης από τις PPP θέσεις μέσω του DRB δεν εμπόδισε την ανίχνευση σημαντικών επιπέδων

start-RNAs μετά την έκθεση σε UV, σε αντίθεση με την ξεκάθαρη μείωση των επιπέδων των start-RNAs έπειτα από αναστολή της έναρξης της μεταγραφής μέσω του TRP (Εικόνα 41, two sided Student's t test $P = 0.0037$ συγκριτικά με "NO UV/+DRB/T 2.5h", $P = 0.0016$ συγκριτικά με "+ UV/- DRB/T 2.5h" και $P = 0.0009$ συγκριτικά με "+ UV/+DRB/T 2.5h"), δείχνοντας με τον τρόπο αυτό πως μετά την έκθεση σε UV, η μεταγραφική έναρξη και η συνοδευόμενη σύνθεση RNA, λαμβάνει χώρα στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές.

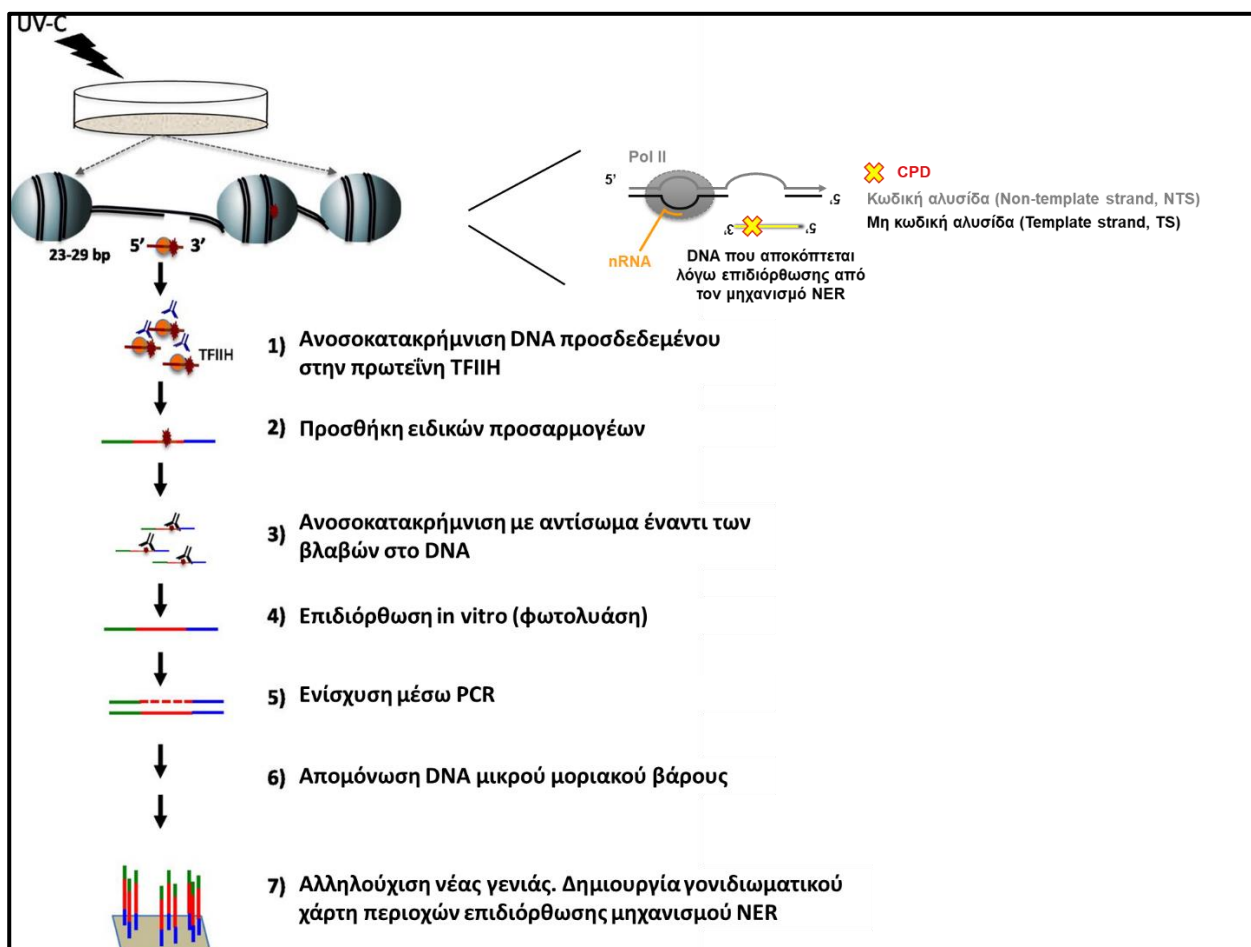


Εικόνα 41. Ανάλυση qPCR των start-RNAs στις πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται στην Εικόνα 34. Οι τιμές έκφρασης υπολογίστηκαν σε σχέση με την πειραματική συνθήκη +TRP. Οι γραμμές σφάλματος στα ραβδογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου (Standard Error of the Mean, S.E.M), ενώ αναγράφεται και η τιμή σημαντικότητας (p value) που προέκυψε από την στατιστική διαδικασία Student's test.

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν πως νέα Pol II-ηγο μόρια στρατολογούνται στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής (κωδικές και μη κωδικές) καθ' όλη τη διάρκεια της ανάκαμψης των κυττάρων μετά από έκθεση σε UV. Ακόμη, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν πως τα Pol II μόρια προωθούνται στα στάδια της έναρξης και της επιμήκυνσης της μεταγραφής σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, long non coding (lnc) RNA, PROMPTs και ενεργούς ενισχυτές. Τα συγκεκριμένα ευρήματα συμφωνούν με πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ινοβλάστες δέρματος, οι οποίες προτείνουν πως η έκθεση σε UV-C ακτινοβολία επιδρά ανασταλτικά, κυρίως στο στάδιο επιμήκυνσης, παρά στο στάδιο έναρξης της μεταγραφής (Andrade-Lima et al. 2015; Lavigne et al. 2017). Ακόμη, παρά το γεγονός πως η επιμήκυνση επιβραδύνεται, καθώς η Pol II σταματάει στα σημεία των βλαβών, σημαντική μεταγραφική δραστηριότητα παρατηρείται στις περιοχές των υποκινητών (Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017).

5.7 Αντίστοιχα επίπεδα Pol II-ηγο στις θέσεις PIC συντελούν σε ομοιόμορφο TC-NER

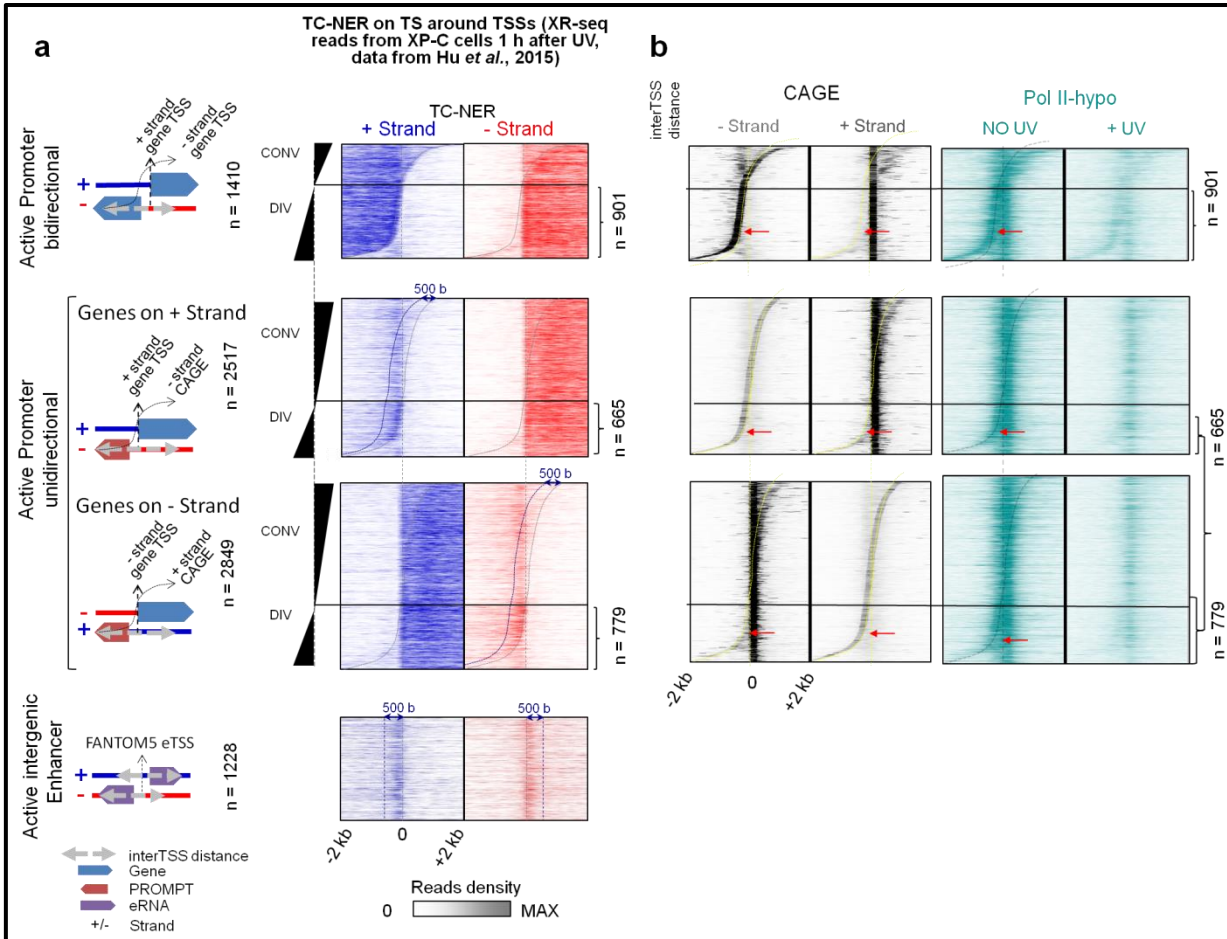
Για να αποσαφηνιστούν οι λειτουργικές προεκτάσεις της συνεχούς μεταγραφικής έναρξης κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης των κυττάρων, μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, στις ενεργές ρυθμιστικές περιοχές, πραγματοποιήσαμε συσχέτιση των δεδομένων μας με τα XR-seq (eXcision Repair sequencing) δεδομένα (Hu et al. 2015), τα οποία παρέχουν έναν γονιδιωματικό χάρτη των αλληλουχιών που αποκόπτονται από το DNA ως μέρος της επιδιόρθωσης μέσω του μηχανισμού NER (βλέπε Εισαγωγή, Κεφάλαιο 2.2.2, Εικόνα 42). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα επιδιόρθωσης των βλαβών CPD από XP-C κύτταρα (μη λειτουργικό GG-NER μονοπάτι), με σκοπό να εστιάσουμε στα επίπεδα επιδιόρθωσης που απορρέουν αποκλειστικά από το TC-NER μονοπάτι του NER.



Εικόνα 42. Γραφική αναπαράσταση της αρχής μεθόδου XR-seq. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την χαρτογράφηση, σε γονιδιωματικό επίπεδο, των κομματιών DNA που απομακρύνονται κατά την δράση του επιδιορθωτικού μηχανισμού NER, σε περιοχές που έχουν υποστεί βλάβη από την UV ακτινοβολία (τροποποίηση από Adar et al. 2016).

Τα XR-seq δεδομένα επιτρέπουν την χαρτογράφηση της επιδιόρθωσης και στις δύο αλυσίδες του DNA, δηλαδή σε αυτήν που λειτουργεί ως μήτρα (μη κωδική, (+)) αλλά και στην αντίστροφα συμπληρωματική της (κωδική, (-))(Εικόνα 43a). Ταξινομώντας τις TSS περιοχές σύμφωνα με την μεταξύ τους CAGE απόσταση (βλέπε Εικόνες 29-30), παρατηρήθηκε πως οι περιοχές έναρξης εμφάνισης TC-NER σήματος

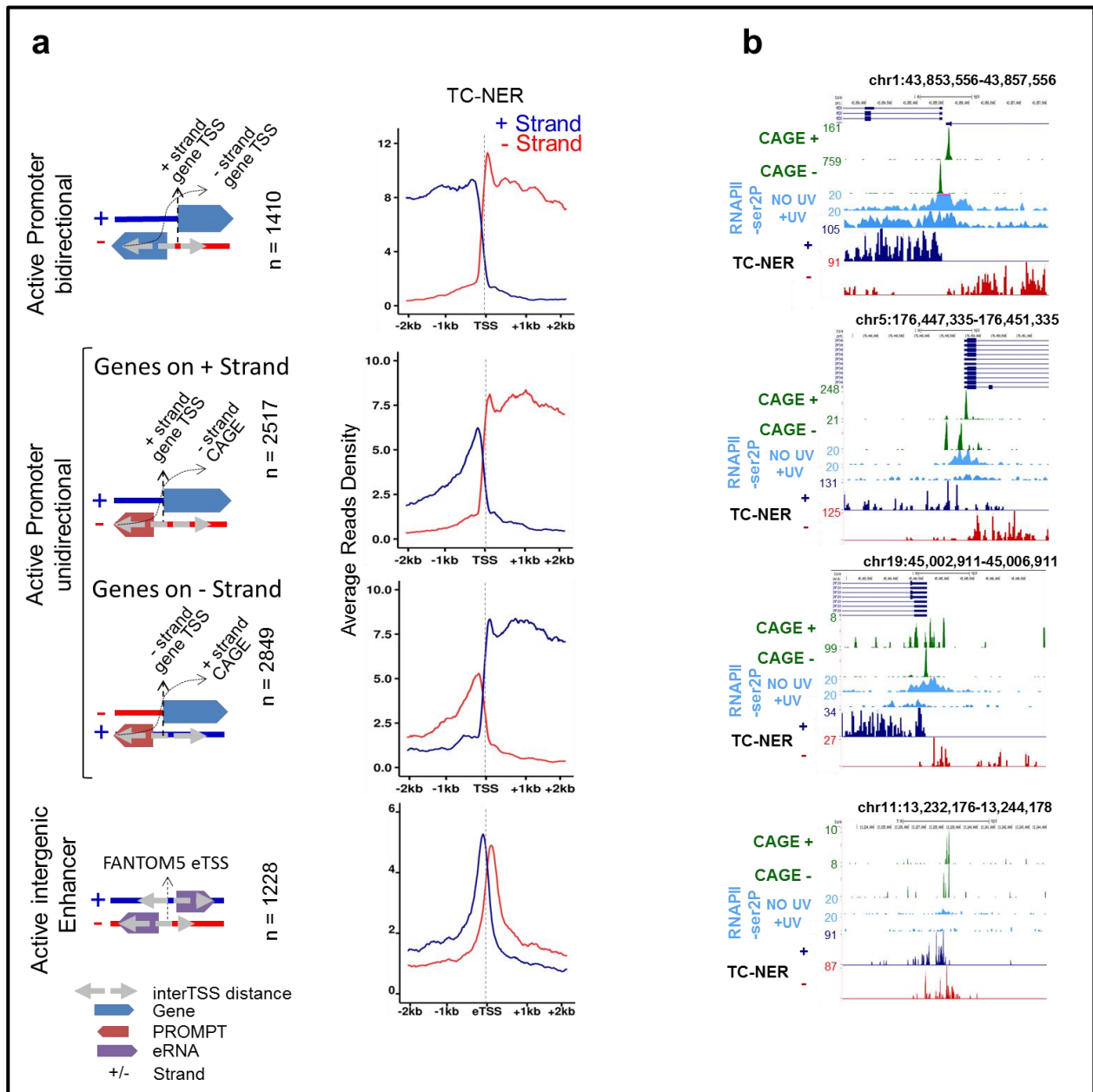
συμπίπτουν με το αντίστοιχο σήμα CAGE, γεγονός που επιβεβαιώνει πως τόσο η επιδιορθωτική δραστηριότητα μέσω του TC-NER, όσο και το CAGE σήμα, μπορεί με ακρίβεια να προσδιορίσει τις TSS περιοχές (Εικόνα 43a, b, Εικόνα 44b).



Εικόνα 43. α. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει το TC-NER σήμα σε + και - κλώνους του DNA, σε περιοχές 1 kb εκατέρωθεν του TSS, για τις κατηγορίες γονιδίων και ενισχυτών που αναφέρονται στα αριστερά της εικόνας. Το σήμα XR-seq αφορά XP-C κύτταρα 1 h μετά την ακτινοβόλησή τους (δεδομένα από Hu et al. 2015). Το διάγραμμα αφορά τις γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν των TSS. β. Διαγράμματα τύπου heatmap που απεικονίζουν το σήμα CAGE σε + και - κλώνο του DNA, καθώς και το ChIP-seq Pol II-ηγρο σήμα σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV) κύτταρα, για τις γονιδιωματικές κατηγορίες των ενεργών υποκινητών διπλής κατεύθυνσης (active bidirectional promoters) και των ενεργών υποκινητών μονής κατεύθυνσης (active unidirectional genes). Το διάγραμμα αφορά τις γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν των TSS.

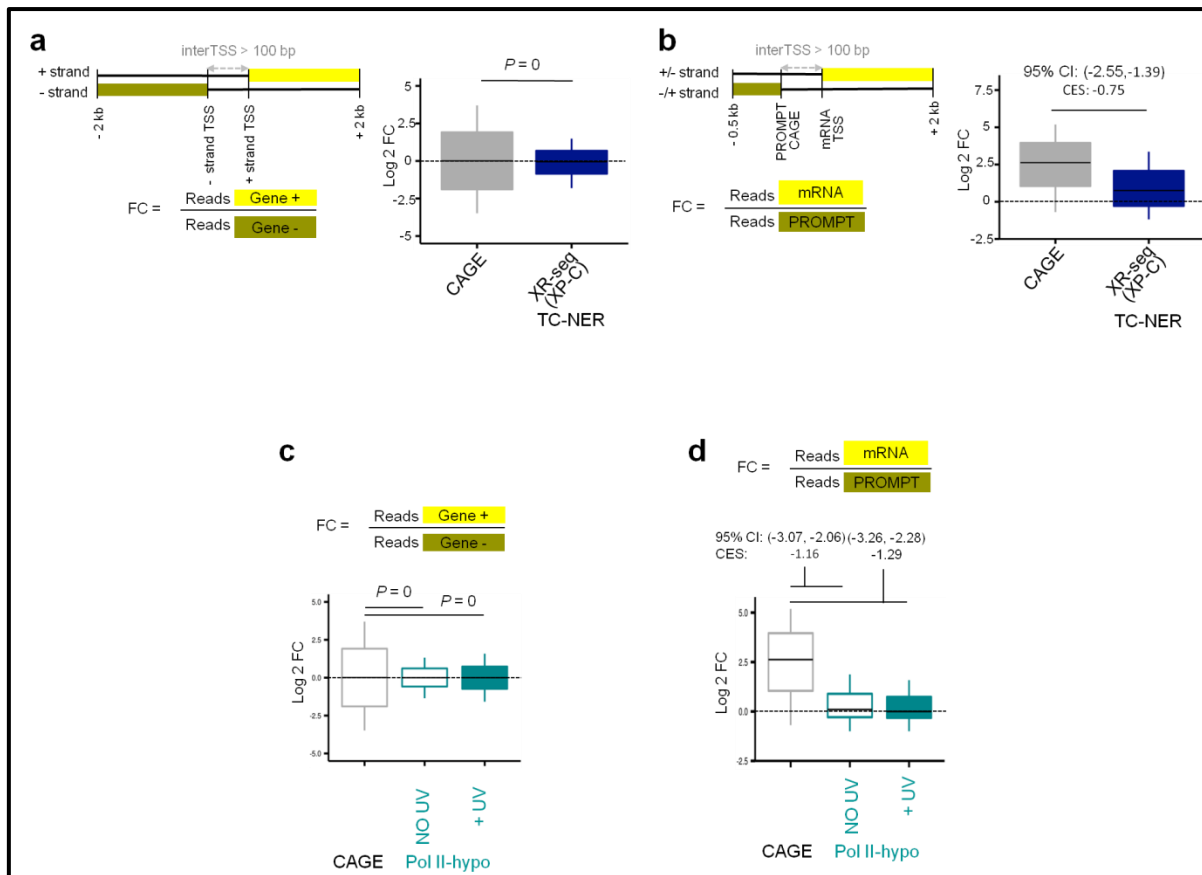
Στους υποκινητές διπλής κατεύθυνσης, το TC-NER σήμα ανιχνεύθηκε σε αντίστοιχα επίπεδα σε κάθε κατεύθυνση (+ ή -), υποδεικνύοντας πως και στις δύο κατευθύνσεις της μεταγραφής η επιδιόρθωση λαμβάνει χώρα με την ίδια αποτελεσματικότητα (43a, 44a active bidirectional promoters). Το παραπάνω εύρημα συμφωνεί με ChIP-seq δεδομένα έναντι της Pol II-ηγρο που υποδεικνύουν παρόμοια επίπεδα Pol II-ηγρο στις θέσεις συγκρότησης του προεναρκτήριου συμπλόκου (Pre-Initiation Complex, PIC), και στις 2 κατευθύνσεις της μεταγραφής, αλλά και με τα CAGE δεδομένα, τα οποία δείχνουν ισορροπημένα επίπεδα σύνθεσης μεταγράφων (mRNA) και στις δύο κατευθύνσεις (Εικόνα 43b). Ωστόσο, περαιτέρω

στατιστική ανάλυση έδειξε πως η μεταβλητότητα της διαφοράς μεταξύ των δύο κατευθύνσεων (+ ή -) ήταν σημαντικά μικρότερα για το TC-NER σήμα, σε σχέση με αυτό του CAGE (Εικόνα 45a).



Εικόνα 44. α. Διαγράμματα απεικόνισης προφίλ μέσω των τιμών του XR-seq σήματος για τις γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS, των γονιδιωματικών κατηγοριών που περιγράφηκαν στην Εικόνα 29. Χρησιμοποιήθηκαν τα XR-seq δεδομένα από Hu et al. 2015. β. Στιγμιότυπα του UCSC Genome Browser που απεικονίζουν αντιπροσωπευτικές γονιδιωματικές περιοχές, για τις διάφορες κατηγορίες γονιδίων και ενισχυτών, όπως αυτές περιγράφονται στην Εικόνα 29. Απεικονίζονται το σήμα CAGE σε + και - κλώνο (πράσινο), το ChIP-seq σήμα για Pol II-ser2P (NO UV, +UV, γαλάζιο) και το σήμα TC-NER XR-seq στον + (μπλε σκούρο) και - (κόκκινο) κλώνο του DNA.

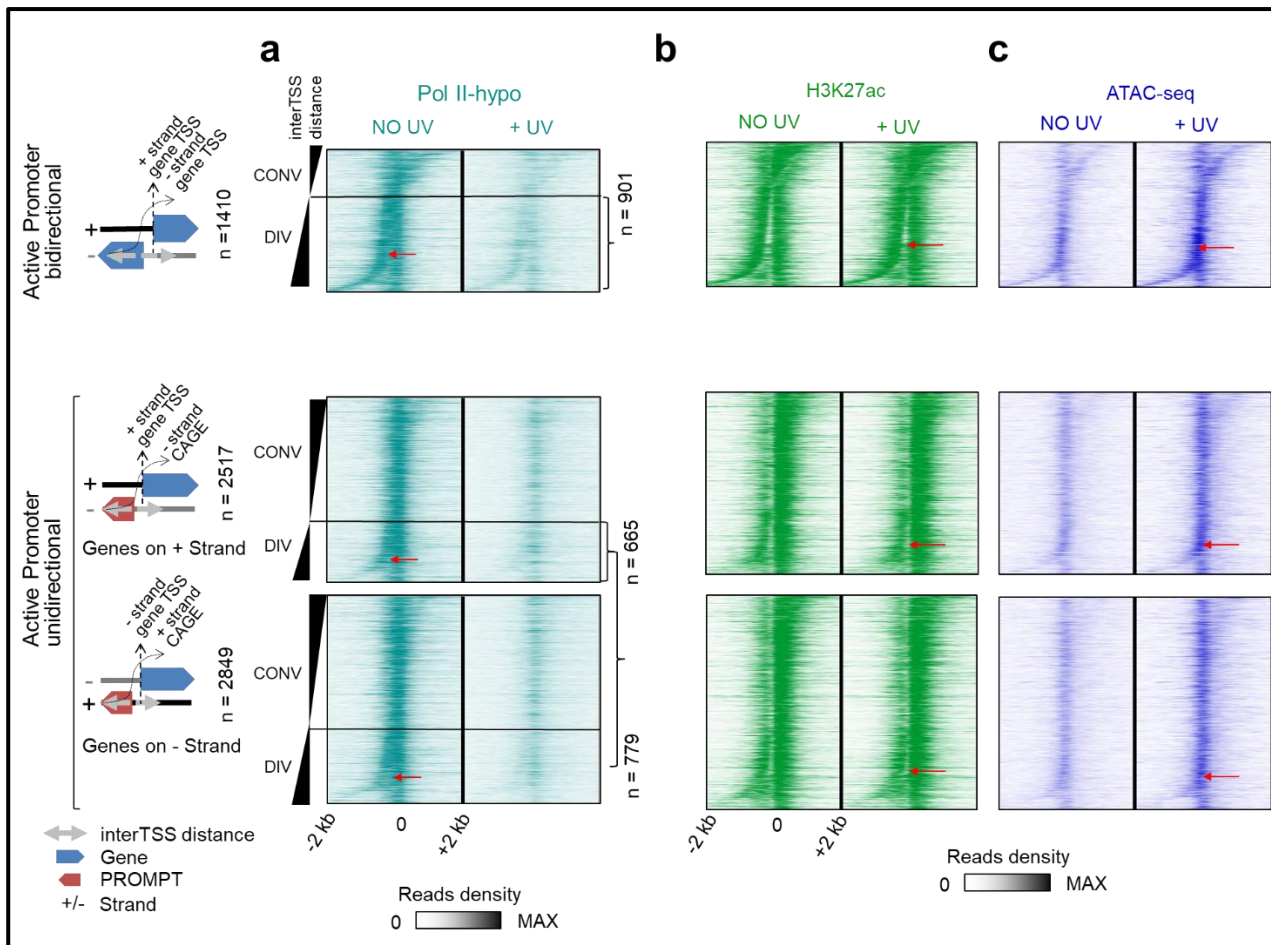
Στην περίπτωση των υποκινητών μονής κατεύθυνσης, επιβεβαιώθηκε (Hu et al. 2015) πως οι γονιδιωματικές περιοχές των PROMPTs εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα επιδιόρθωσης. Όπως και στην περίπτωση των υποκινητών διπλής κατεύθυνσης, στα γονίδια μονής κατεύθυνσης (unidirectional) το σήμα του TC-NER στην αρχή των γονιδίων, συμπίπτει με αυτό του CAGE (Εικόνες 43a, b, Εικόνα 44b).



Εικόνα 45. α. (Αριστερά) Σχηματική αναπαράσταση των γονιδιωματικών περιοχών (σε – και + κλώνο του DNA) που λήφθηκαν υπ’ όψιν για τον υπολογισμό της διαφοράς των λογαρίθμων (Log_2FC) μεταξύ + και – κλώνων, για τους υποκινητές διπλής κατεύθυνσης οι οποίοι παρουσιάζουν μη επικαλυπτόμενη μεταγραφή. (Δεξιά) Διάγραμμα τύπου box plot που απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των log_2FC που περιγράφονται στο α για το CAGE-seq και XR-seq σήμα. Η πιθανότητα P εκφράζει το ποσοστό των μη στατιστικώς σημαντικών F-tests (F-test p value ≥ 0.05), ανά 10.000 test. **β.** Όπως στο α αλλά για τους ενεργούς υποκινητές μονής κατεύθυνσης, που παρουσιάζουν μη επικαλυπτόμενη μεταγραφή. **γ.** Όπως στο α αλλά για το σήμα CAGE και ChIP-seq Pol II-hypo (NO UV και +UV) **δ.** Όπως στο β αλλά για το σήμα CAGE και ChIP-seq Pol II-hypo (NO UV και +UV).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, πως στα μεταγραφικά ζεύγη mRNA-PROMPT ο λόγος (Log_2FC) του σήματος TC-NER μεταξύ mRNAs και PROMPTs ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο λόγο του CAGE σήματος (Εικόνα 45b, 95 % CI αποκλείει το 0). Η ομοιογένεια αυτή του TC-NER στις 2 κατευθύνσεις της μεταγραφής, συμφωνεί με αυτήν του σήματος των πειραμάτων ChIP-seq Pol II-hypo (Εικόνα 43b, 45d). Στο ίδιο πλαίσιο, η επιδιόρθωση στους ενισχυτές μέσω TC-NER, λόγω της αμφίδρομης μεταγραφής που παρατηρείται, φαίνεται να είναι υψηλότερη από ότι θα αναμενόταν με βάση τα επίπεδα του CAGE σήματος στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές (Εικόνα 43a, 44a). Γενικότερα, η ομοιόμορφη πρόσδεση Pol II-hypo στα PIC, αντικατοπτρίζει τα ισορροπημένα επίπεδα του XR-seq που ανιχνεύονται στις μεταγραφόμενες περιοχές σε ακτινοβολημένα με UV κύτταρα.

Συνδυαστικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι, η γενικευμένη απελευθέρωση των μορίων Pol II από τις PPP θέσεις μετά τη UV, μεγιστοποιεί την επιδιόρθωση του DNA στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές (mRNAs, PROMPTs, ενισχυτές) ανεξαρτήτως των επιπέδων έκφρασης που επιδεικνύουν οι διάφοροι μεταγραφόμενοι γονιδιωματικοί τύποι πριν την έκθεση σε UV.



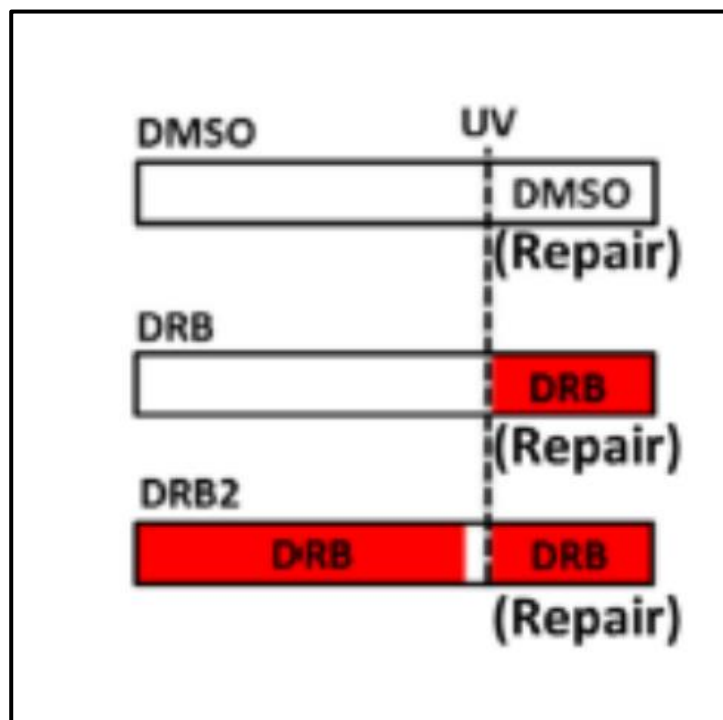
Εικόνα 46. Διαγράμματα τύπου heatmap που απεικονίζουν την ένταση του σήματος ChIP-seq για την Pol II-hypo (a), H3K27ac (b) και του ATAC-seq σήματος (c) σε μη ακτινοβολημένα (NO UV) και ακτινοβολημένα (+UV) κύτταρα Vh10-htert ινοβλαστών δέρματος, για τις κατηγορίες γονιδίων που αναφέρονται στα αριστερά της εικόνας. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS. Τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν τις περιοχές ελεύθερες από νουκλεοσώματα (Nucleosome Depleted Regions, NDR).

5.8 Η συνεχής μεταγραφική έναρξη τροφοδοτεί και μεγιστοποιεί την επιδιόρθωση μέσω TC-NER

Στη συνέχεια εστίασαμε στην προσπάθεια αποσαφήνισης του βιολογικού ρόλου και της λειτουργικότητας της συνεχούς μεταγραφικής έναρξης που λαμβάνει χώρα στις ενεργές ρυθμιστικές περιοχές, κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης των κυττάρων μετά από έκθεση σε UV. Προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν (Lavigne et al. 2017) πως όταν αναστέλλεται η απελευθέρωση των Pol II μορίων από τις θέσεις PPP μετά την UV ακτινοβολία, τα Pol II μόρια που ήδη βρίσκονται στην φάση επιμήκυνσης της μεταγραφής, αδυνατούν να επιδιορθώσουν (μέσω πυροδότησης του TC-NER) ολόκληρο το μεταγραφόμενο γονιδίωμα. Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις αυτές, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν πως τα Pol II μόρια που συναντούν τις UV επαγόμενες βλάβες και σταματούν στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές, απομακρύνονται από τον μεταγραφόμενο κλώνο του DNA, μέσω ουβικιτίνωσης (Chiu et al. 2018). Τα παραπάνω δεδομένα συνάδουν με την αναγκαιότητα συνεχούς

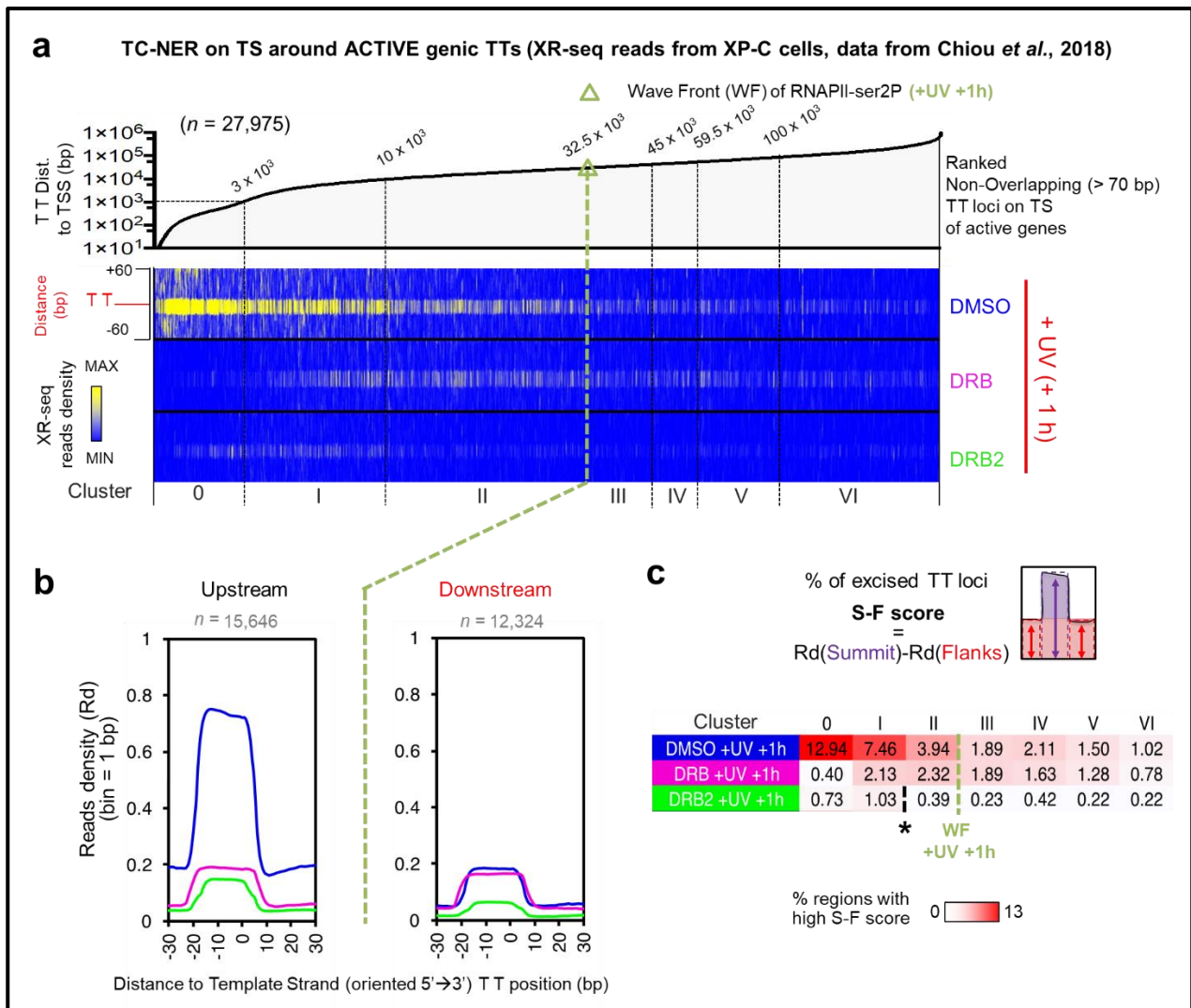
τροφοδότησης του επαγόμενου από την UV μεταγραφικού κύματος (Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017), προκειμένου να μπορέσει να επιδιορθωθεί το μεταγραφόμενο γονιδίωμα, στο σύνολό του.

Για να ελέγξουμε την υπόθεση αυτή, εξετάσαμε το σήμα XR-seq (γονιδιωμιατικός χάρτης αλληλουχιών που αποκόπτονται από το DNA ως μέρος της επιδιόρθωσης μέσω του μηχανισμού NER) στις περιοχές των διμερών θυμίνης (TT) χρησιμοποιώντας δεδομένα κυττάρων XP-C ασθενών, ακτινοβολημένα σε συνθήκες που επιτρέπουν απελευθέρωση της Pol II από τις PPP θέσεις, μόνο για περιορισμένο χρονικό διάστημα (DRB2 πείραμα στο (Chiou et al. 2018), βλέπε Εικόνα 47).



Εικόνα 47. Αναπαράσταση πειραματικού χρονοδιαγράμματος όπως αυτό πραγματοποιήθηκε από τους Chiou et al. 2018. Στην πειραματική συνθήκη DMSO τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με UV (20J/m²) και επώαστηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Στην πειραματική συνθήκη DRB τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε DRB (100μM). Στην πειραματική συνθήκη DRB2, τα κύτταρα προεπώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό με DRB για 2 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό τους υλικό αντικαταστάθηκε με φυσιολογικό θρεπτικό για 10 λεπτά (γεγονός που επιτρέπει την απελευθέρωση ορισμένων Pol II μορίων από τις θέσεις PPP). Έπειτα τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με UV και επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε DRB. Ανατύπωση από (Chiou et al. 2018).

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως, όταν τα ακτινοβολημένα κύτταρα επώάζονται με DRB (πειραματική συνθήκη DRB, Εικόνα 48a), η επιδιόρθωση των TTs στις περιοχές μεταξύ του TSS και του σημείου στο οποίο αναμένεται να έχει φθάσει το μεταγραφικό κύμα 1 h μετά τη UV, φαίνεται σημαντικά μειωμένη (Εικόνα 48a-c σύγκριση XR-seq σήματος μεταξύ πειραματικών συνθηκών DMSO, DRB).

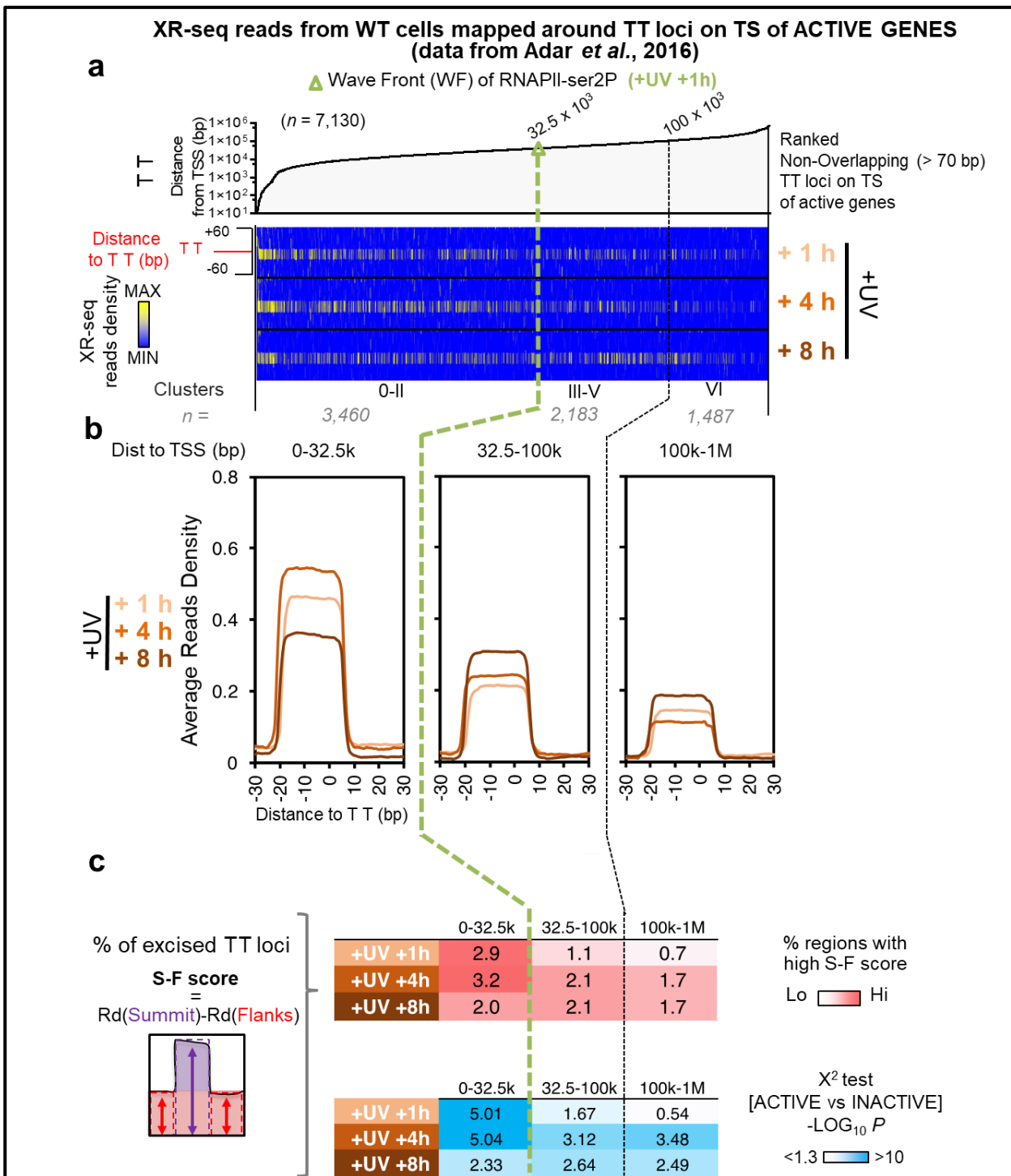


Εικόνα 48. Διάγραμμα τύπου heatmap το οποίο αποτυπώνει την κατανομή του XR-seq σήματος από XP-C κυτταρα (Chiou et al. 2018), γύρω από τα TTs (60 bp εκατέρωθεν) της μη-κωδικής αλυσίδας (Template Strand, TS), των ενεργών γονιδίων. Στο διάγραμμα υπογραμμίζεται (με διακεκομμένη πράσινη γραμμή), η θέση του μεταγραφικού κύματος ((Wave Front, WF), Pol II-ser2P από (Lavigne et al. 2017)) 1 h μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Τα TTs ταξινομήθηκαν ως προς την απόστασή τους από το TSS. Οι πειραματικές συνθήκες DMSO, DRB, DRB2 αντιστοιχούν στις διαδικασίες που έχουν περιγραφεί στην Εικόνα 47. **b.** Διαγράμματα προφίλ μέσω των τιμών του XR-seq σήματος για τις γονιδιωματικές περιοχές του **a**, απεικονίζοντας το σήμα ανοδικά (ομάδες (clusters) 0, I, II) και καθοδικά (III, IV, V, VI) του WF, όπως αυτό υπολογίζεται 1 h μετά την ακτινοβολία. **c.** Διάγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό (%) των TTs που αποκόπηκε μέσω του μηχανισμού NER, όπως αυτό υπολογίστηκε από τη διαφορά του XR-seq σήματος μεταξύ των κορυφών (Summit, S) και των πλευρών (Flanks, F) (S-F) του σήματος, για όλες τις ομάδες (clusters) που απεικονίζονται στο **a**.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων DRB2 (βλέπε Εικόνα 47) τα οποία δείχνουν πως όταν περιορισμένος αριθμός Pol II μορίων βρίσκεται στη φάση επιμήκυνσης τη στιγμή της ακτινοβολίας, η επιδιόρθωση των γονιδιωματικών τόπων τόσο κοντά όσο και μακριά από το TSS μειώνεται (Εικόνα 48, σύγκριση μεταξύ XR-seq σήματος στις πειραματικές συνθήκες DMSO και DRB2). Τα παραπάνω υποδεικνύουν πως η συνεχής τροφοδότηση Pol II μορίων, από τις TSS θέσεις προς

το εσωτερικό των ενεργών γονιδίων, καθίσταται απαραίτητη για την επιτυχή επιδιόρθωση του μεταγραφόμενου γονιδιώματος.

Στο ίδιο πλαίσιο, χρησιμοποιώντας XR-seq δεδομένα φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος που αφορούν τη μη κωδική αλυσίδα του DNA (Adar et al. 2016), εστίασαμε στις αντίστοιχες περιοχές των TTs και παρατηρήσαμε πως σημαντικά επίπεδα επιδιόρθωσης παρατηρούνται στις περιοχές καθοδικά του TSS, όχι μόνο 1 h μετά την ακτινοβολήση αλλά στις 4 h και 8 h μετά από έκθεση σε UV (Εικόνα 49). Ακόμη παρατηρήθηκε πως με την πάροδο του χρόνου η επιδιορθωτική δραστηριότητα μετατοπίζεται από το 5' προς το 3' άκρο των γονιδίων (Εικόνα 49 b, c, σύγκριση σήματος μεταξύ clusters 0-II, III-V, VI).

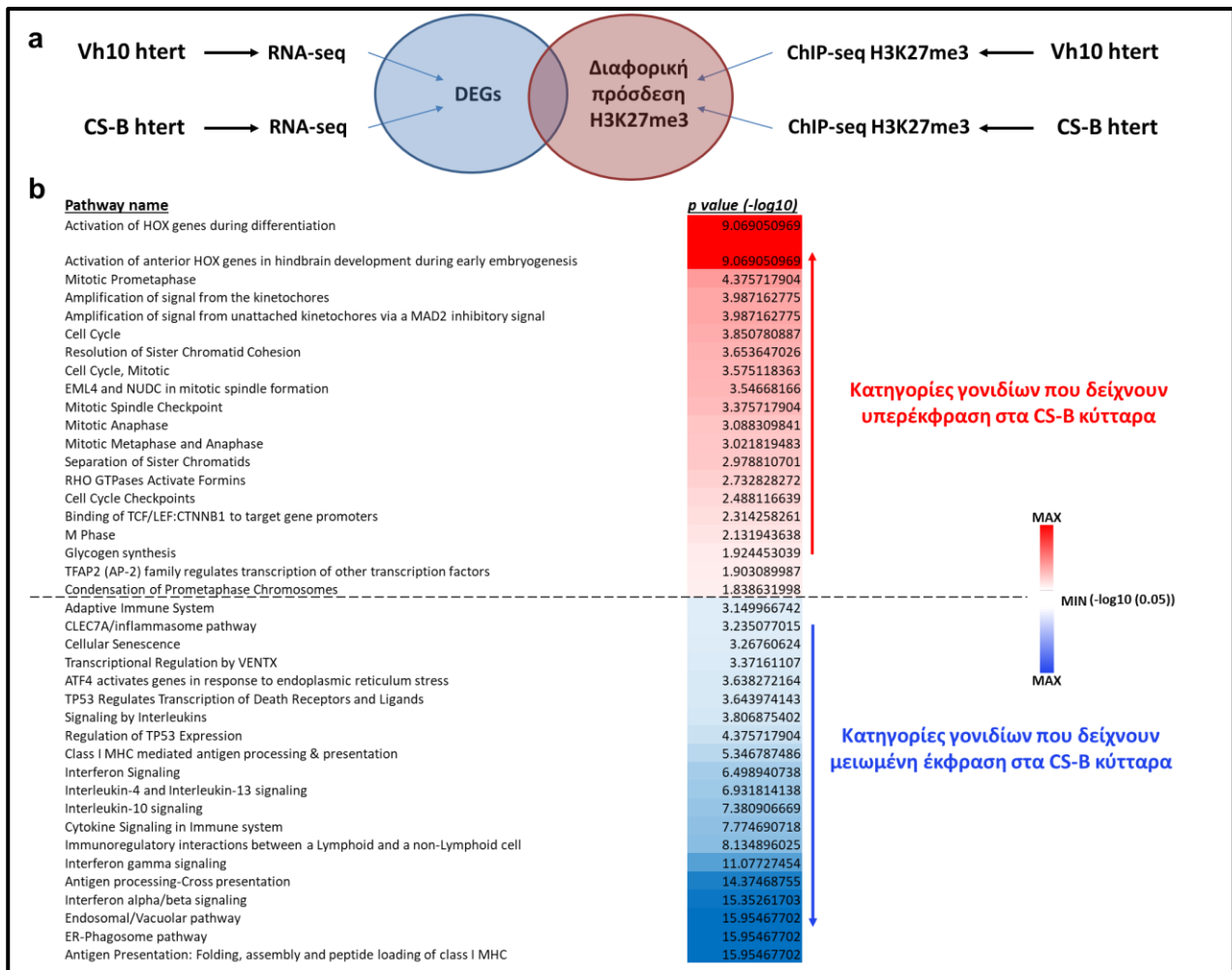


Εικόνα 49. α. Διάγραμμα τύπου heatmap το οποίο αποτυπώνει την κατανομή του XR-seq σήματος (1 h, 4 h, 8 h μετά την ακτινοβόληση με UV) σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος (Adar *et al.* 2016), γύρω από τα TTs (60 bp εκατέρωθεν) της μη-κωδικής αλυσίδας (Template Strand, TS) των ενεργών γονιδίων. Στο διάγραμμα υπογραμμίζεται (με διακεκομμένη πράσινη γραμμή), η θέση του μεταγραφικού κύματος ((Wave Front, WF), Pol II-ser2P από (Lavigne *et al.* 2017)) 1 h μετά την ακτινοβόληση από UV. Τα TTs ταξινομήθηκαν ως προς την απόστασή τους από το TSS. β. Διαγράμματα προφίλ μέσω τιμών του XR-seq σήματος για τις γονιδιωματικές περιοχές του α, απεικονίζοντας το σήμα για τις ομάδες (clusters) 0-II, III-IV και VI, στις πειραματικές συνθήκες 1 h, 4 h, 8 h μετά από ακτινοβόληση. γ. Διαγράμματα τύπου heatmap που δείχνουν το ποσοστό (%) των TTs που αποκόπηκε μέσω NER, όπως αυτό υπολογίστηκε από τη διαφορά του XR-seq σήματος μεταξύ των κορυφών (Summit, S) και των πλευρών (Flanks, F) (S-F) του σήματος, για όλες τις ομάδες (clusters) που απεικονίζονται στην Εικόνα.

5.9 Συσχέτιση μεταξύ επιγενετικών ρυθμίσεων και διαφορών της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ Vh10 και CS-B κυττάρων

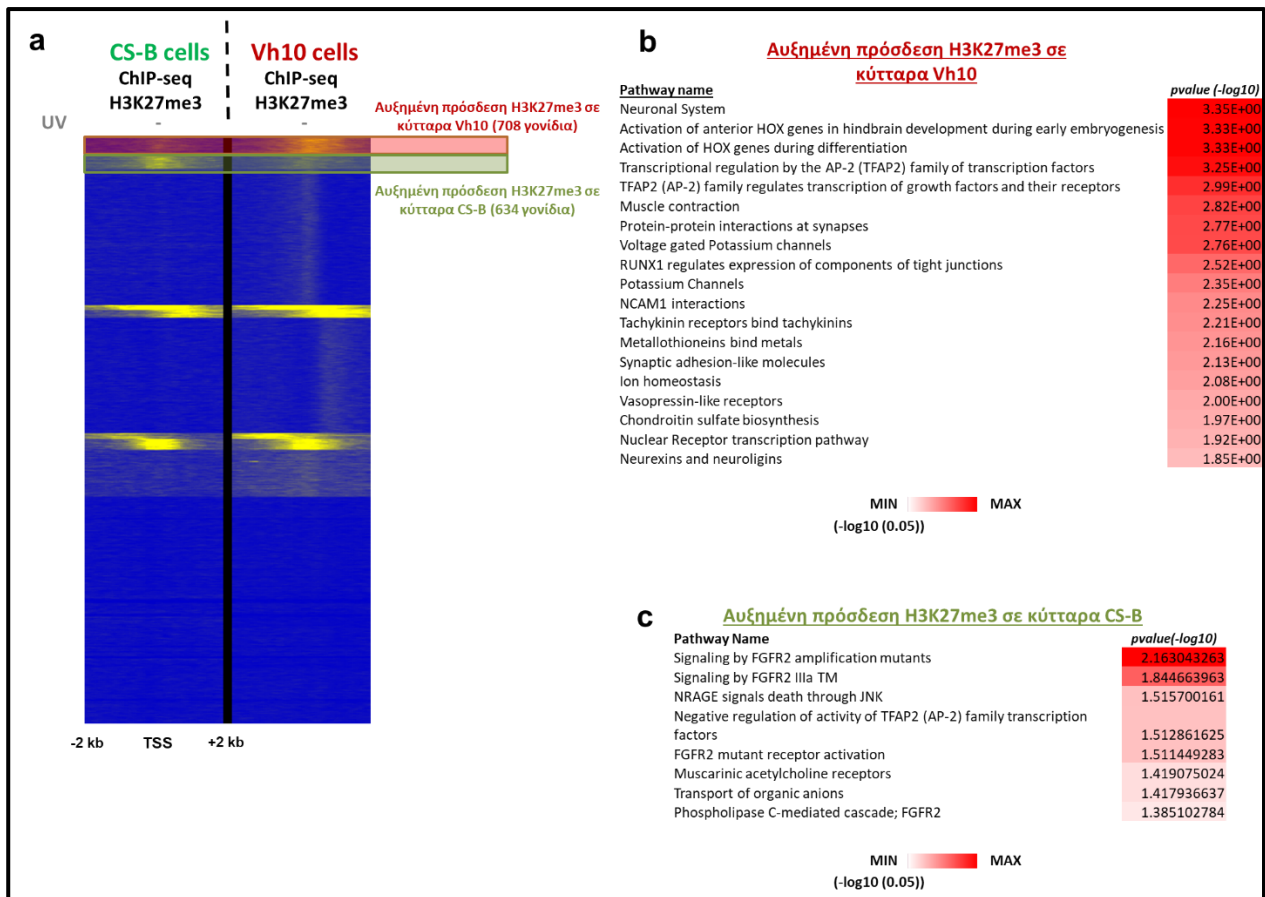
Εκτός από τον κομβικό ρόλο της πρωτεΐνης CSB στην επιδιόρθωση μέσω του TC-NER μονοπατιού, η λειτουργία της CSB ως ATP εξαρτώμενο SWI-SNF σύμπλοκο αναδόμησης χρωματίνης (Citterio et al. 2000), η αλληλεπίδρασή της με το μόριο της Pol II (Tantin et al. 1997), αλλά και μελέτες που εστίασαν στο διαφορικό μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης CSB κυττάρων που εκφράζουν εξωγενώς ή όχι την CSB πρωτεΐνη (Newman et al. 2006; Wang et al. 2014), εμπλέκουν άμεσα την πρωτεΐνη αυτή στην διαδικασία της μεταγραφής και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, γενικότερα. Εξάλλου, έχει προταθεί πως το CS θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «μεταγραφικό σύνδρομο», λαμβάνοντας υπόψιν την μεταγραφική απορρύθμιση που συνοδεύει την ασθένεια (Brooks 2013).

Για να εντοπιστούν διαφορές στην γονιδιακή έκφραση μεταξύ μη ακτινοβολημένων φυσιολογικών (Vh10) και CS-B ινοβλαστών δέρματος πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα RNA-seq πειράματα στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως υπάρχουν 843 γονίδια που παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) στην έκφραση (Differentially Expressed Genes, DEGs) μεταξύ Vh10 και CS-B κυττάρων. Συγκεκριμένα, 472 γονίδια φαίνεται να παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα CS-B κύτταρα ενώ αντίθετα, 371 γονίδια φαίνονται να υπερεκφράζονται στα CS-B σε σχέση με τα Vh10. Στην εικόνα 50 παρουσιάζονται τα 20 κορυφαία στατιστικώς σημαντικά εμπλουτισμένα βιολογικά μονοπάτια οντολογίας γονιδίων, με τα οποία σχετίζονται τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια που προαναφέρθηκαν, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Reactome (Fabregat et al. 2016). Η ανάλυση αυτή έδειξε πως η απουσία της CS-B πρωτεΐνης σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την ανάπτυξη του οργανισμού και παράλληλη μείωση στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή.



Εικόνα 50. α. Πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την συσχέτιση διαφορών της γονιδιακής έκφρασης και επιγενετικών διαφορών, μεταξύ CS-B και Vh10 κυττάρων. **β.** Πίνακας που αναφέρει τα κορυφαία 20 στατιστικώς σημαντικά μοριακά μονοπάτια, που σχετίζονται με τα γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη (κόκκινο) ή μειωμένη (μπλε) έκφραση στα CS-B κύτταρα. Τα μονοπάτια για κάθε κατηγορία, ταξινομήθηκαν κατά φθίνουσας στατιστικής σημαντικότητας (μικρότερο $-\log_{10}(p \text{ value})$).

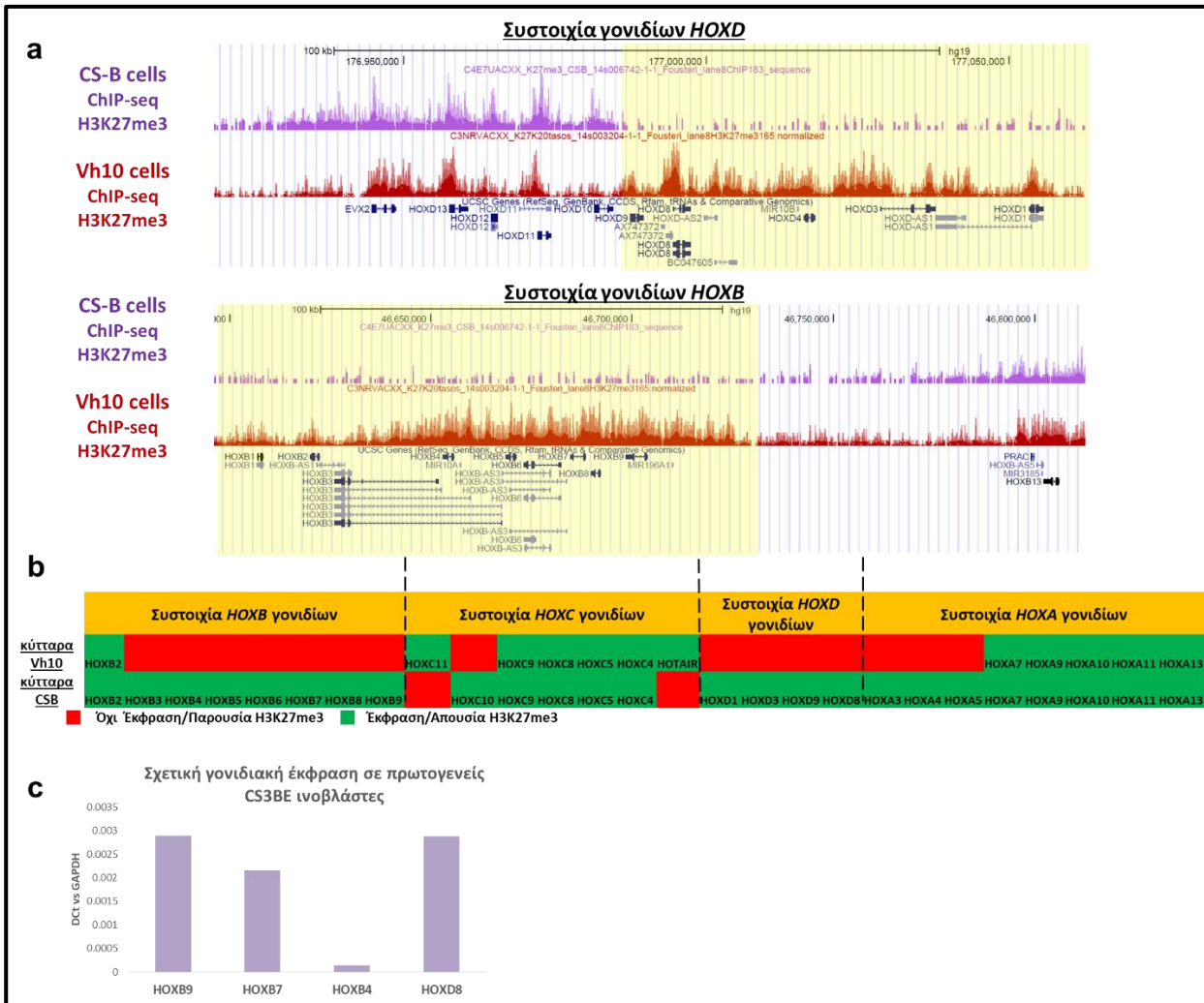
Για να ελεγχθεί αν οι συγκεκριμένες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, σχετίζονται με επιγενετικές αλλαγές στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές, πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα CS-B και στη συνέχεια συγκρίθηκαν οι κατανομές σήματος των ChIP-seq H3K27me3 μεταξύ μη ακτινοβολημένων Vh10 και CS-B κυττάρων. Ανάλυση του ChIP-seq σήματος των δύο πειραμάτων έδειξε πως υπάρχουν 2 ομάδες γονιδίων (clusters), οι οποίες εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην πρόσδεση της συγκεκριμένης μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (Εικόνα 51a). Μάλιστα, φάνηκε πως στις συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων, το σήμα της τροποποίησης H3K27me3 παρουσιάζει ένα αμοιβαίως αποκλειόμενο πρότυπο: στα ίδια γονίδια στα οποία σε CS-B κύτταρα απουσιάζει η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση, στα Vh10 κύτταρα εμφανίζεται H3K27me3 σήμα στις περιοχές των υποκινητών και αντίστροφα. Συνολικά, βρέθηκε πως 1342 γονίδια παρουσιάζουν διαφορές στο πρότυπο H3K27me3 μεταξύ Vh10 και CS-B κυττάρων. Τα μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με αυτές τις ομάδες γονιδίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 51b, c.



Εικόνα 51. a. Διάγραμμα τύπου heatmap που απεικονίζει το ChIP-seq σήμα έναντι της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης H3K27me3, σε CS-B htert και Vh10 htert κύτταρα αντίστοιχα, χωρίς την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές 2 kb εκατέρωθεν του TSS. Με κόκκινο και πράσινο χρώμα σημαίνονται οι ομάδες γονιδίων που εμφανίζουν αυξημένη πρόσδεση του H3K27me3 σε Vh10 και CS-B κύτταρα, αντίστοιχα. **b.** Μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με γονίδια που εμφανίζουν αυξημένη πρόσδεση στα Vh10 κύτταρα σε σχέση με τα CS-B. Τα μονοπάτια για κάθε κατηγορία, ταξινομήθηκαν κατά φθίνουσας στατιστικής σημαντικότητας (μικρότερο $-\log_{10}(p \text{ value})$). **c.** Όπως στο b αλλά για τα γονίδια που εμφανίζουν αυξημένη πρόσδεση H3K27me3 στα CS-B κύτταρα.

Εξετάζοντας με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα μοριακά μονοπάτια και τις λειτουργίες των γονιδίων που σχετίζονται με διαφορεικό H3K27me3 πρότυπο φάνηκε πως πολλά γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη υπερεκφράζονται στα CS-B κύτταρα, ενώ στα Vh10 κύτταρα φαίνονται να μην εκφράζονται και ταυτόχρονα να βρίσκονται σημασμένα με την H3K27me3. Το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στα γονίδια *HOX*, όπου παρατηρήθηκε πως μεγάλα τμήματα του γονιδιώματος όπου εδράζονται οι συστοιχίες των συγκεκριμένων γονιδίων, παρουσιάζουν ακριβώς αντίθετο πρότυπο πρόσδεσης της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης H3K27me3, στα Vh10 σε σχέση με τα CS-B κύτταρα (Εικόνα 52a). Στην Εικόνα 52b φαίνονται τα γονίδια της ομάδας *HOX* που παρουσιάζουν διαφορεικό πρότυπο έκφρασης και στόχευσης με H3K27me3, μεταξύ Vh10 και CS-B κυττάρων. Συμπερασματικά, φάνηκε πως μεταξύ φυσιολογικών (Vh10) και CS-B ινοβλαστών, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές που αφορούν την έκφραση αλλά και την επιγενετική στόχευση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση.

Στη συνέχεια, για να αποσαφηνιστεί αν η ανωτέρω μεταγραφική και επιγενετική απορρύθμιση αφορά αποκλειστικά τους CS-B ινοβλάστες ή μπορεί να αποτελεί γενικευμένο γνώρισμα των CS κυττάρων, ελέγχθηκε αν σε πρωτογενείς CS-A ινοβλάστες δέρματος (CS3BE) παρατηρείται έκφραση των συγκεκριμένων *HOX* γονιδίων. Τα πειράματά μας έδειξαν πως, όπως στα CS-B htert κύτταρα, στα CS3BE κύτταρα εντοπίζεται έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων (Εικόνα 52c). Φαίνεται λοιπόν πως η απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *HOX*, οφείλεται σε μη ορθή στόχευση των γονιδίων από το PRC2 και αποτελεί γενικευμένο χαρακτηριστικό των CS κυττάρων.



Εικόνα 52. **a.** Απεικόνιση του σήματος ChIP-seq H3K27me3, σε CS-B (μωβ) και Vh10 (κόκκινο) κύτταρα, στις περιοχές των συστοιχιών των *HOXD* και *HOXB* γονιδίων, όπως αυτό απεικονίζεται σε στιγμιότυπα από τον UCSSC Genome Browser. Με κίτρινο επισημαίνονται οι περιοχές που εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στο σήμα της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης H3K27me3 μεταξύ των 2 κυτταρικών σειρών. **b.** Πίνακας που παραθέτει τα *HOX* γονίδια που παρουσιάζουν διαφορές τόσο στην έκφραση, όσο και στην στόχευση με H3K27me3, μεταξύ CS-B και Vh10 κυττάρων. **c.** Γράφημα που απεικονίζει την σχετική έκφραση των εικονιζόμενων γονιδίων *HOX* σε πρωτογενή (primary) CS-A (CS3BE) κύτταρα. Η σχετικές τιμές έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τις αντίστοιχες, για το γονίδιο *GAPDH*.

6 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη, παραθέτει νέα μοριακά δεδομένα σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που χαρακτηρίζουν την μεταγραφική απόκριση σε ανθρώπινα κύτταρα, έπειτα από έκθεση σε γενotoξικό στρες (Andrade-Lima et al. 2015; Magnuson et al. 2015; Lavigne et al. 2017; Williamson et al. 2017). Εξετάζοντας την προσβασιμότητα της χρωματίνης, σε Vh10-htert ινοβλάστες, έπειτα από έκθεση σε UV ακτινοβολία, μέσω της μεθόδου ATAC-seq, παρατηρήσαμε μια γενικευμένη αύξηση της προσβασιμότητας στις ενεργές ρυθμιστικές περιοχές (υποκινητές και ενισχυτές), δείχνοντας με τον τρόπο αυτό πως οι συγκεκριμένες περιοχές παραμένουν ανοιχτές κατά τη διάρκεια της περιόδου επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Στο ίδιο πλαίσιο, πειράματα CHIP-seq έδειξαν πως τα η μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K27ac διατηρείται σε σταθερά επίπεδα στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές. Η διατήρηση της χρωματίνης σε ενεργή κατάσταση στα TSSs των ρυθμιστικών περιοχών συνδυάστηκε με τον λεπτομερή διαχωρισμό των γονιδίων, από τα PROMPTs και τους ενισχυτές, όπου και παρατηρήθηκε πως η επαγόμενη από την UV απελευθέρωση των Pol II-Ser2P μορίων από τις PPP θέσεις δεν αφορά μόνο τα ενεργά γονίδια αλλά συμπεριλαμβάνει PROMPTs και ενισχυτές, όπως φαίνεται και από την αύξηση του δείκτη διαφυγής (Escape Index, EI) της Pol II στις αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές. Επιπλέον, τόσο η *de novo* πρόσδεση Pol II-ηγο μορίων στις θέσεις συγκρότησης του PIC, όσο και η ανίχνευση start-RNA μορίων κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης των κυττάρων έπειτα από έκθεση σε UV, υποστηρίζουν ένα μοντέλο όπου το στάδιο της μεταγραφικής έναρξης δεν αναστέλλεται, όπως πιστευόταν παλαιότερα (Rockx et al. 2000; Kristensen et al. 2013; Eranchintsev et al. 2017). Αντιθέτως, φαίνεται πως μια συνεχής διαδικασία μεταγραφικής έναρξης τροφοδοτεί με μόρια Pol II τις διάφορες μονάδες μεταγραφής (γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, PROMPTs, ενισχυτές), με σκοπό την γρήγορη ανίχνευση βλαβών DNA και την άμεση επιδιόρθωση τους μέσω του TCR μονοπατιού. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η γρήγορη απελευθέρωση των Pol II μορίων από τις PPP περιοχές, ωθεί τα μόρια της Pol II να περάσουν γρήγορα από το στάδιο της μεταγραφικής έναρξης σε εκείνο της επιμήκυνσης, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό το σήμα της ανιχνεύσιμης Pol II-ηγο σε όλα τα ενεργώς μεταγραφόμενα TSSs.

Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες, οι οποίες δείχνουν πως (i) σε περιπτώσεις γρήγορης μεταγραφικής επαγωγής μπορεί να υπάρξει σημαντική αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης χωρίς αλλαγές στη θέση παρακείμενων νουκλεοσωμάτων (Mueller et al. 2017) και (ii) η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης (πυροδότηση της μεταγραφής και προώθηση της Pol II στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης της μεταγραφής) συχνά συνοδεύεται από αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης (Gray et al. 2017; Ucar et al. 2017). Ειδικότερα πιστεύουμε πως η αύξηση που παρατηρείται στην προσβασιμότητα της χρωματίνης στις ενεργώς μεταγραφόμενες περιοχές, φαίνεται πως σχετίζεται με την γρήγορη προώθηση των Pol II μορίων από την φάση έναρξης

στη φάση επιμήκυνσης (Εικόνες 22, 23, 25, 30), φαινόμενο που παρατηρείται μετά την έκθεση των κυττάρων σε UV ακτινοβολία. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αύξηση στην προσβασιμότητα της χρωματίνης δεν μελετήθηκε περαιτέρω στο πλαίσιο της διατριβής αυτής, ωστόσο αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρον ποιά μόρια αναδόμησης της χρωματίνης συμμετέχουν στην διαδικασία αυτή, και με ποιόν τρόπο.

Ακόμη, συμπεραίνουμε πως η διατήρηση της τροποποίησης H3K27ac στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής αποτρέπει την εμφάνιση της H3K27me3, καθώς οι δύο αυτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι αλληλοαποκλειόμενες (Karlic et al. 2010). Πράγματι, τα ChIP-seq δεδομένα μας έδειξαν πως ο εντοπισμός της τροποποίησης H3K27me3, καθώς και της υπεύθυνης για τον σχηματισμό της, μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 σε ομάδα μη μεταγραφόμενων γονιδίων, δεν αλλάζει μετά την έκθεση σε UV. Τα παραπάνω συνάδουν με το γεγονός πως η H3K27me3 και εν γένει το PRC2 πιθανότατα δεν διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην επαγόμενη από την UV μεταγραφική απόκριση. Πρόσφατες μελέτες, υποστηρίζουν πως η παρουσία RNA αναστέλλει την στρατολόγηση και περαιτέρω δράση του PRC2 στα ενεργά γονίδια (Kaneko et al. 2014; Beltran et al. 2016). Στην περίπτωση της έκθεσης σε UV ακτινοβολία, πιστεύουμε πως τα nRNA, τα οποία παράγονται κατά την ενεργοποίηση και προώθηση των μορίων Pol II στην παραγωγική επιμήκυνση, παρεμποδίζουν την πρόσδεση του PRC2 στη χρωματίνη και την εναπόθεση της τροποποίησης H3K27me3.

Από την άλλη μεριά, η διατήρηση των επιπέδων και του προτύπου πρόσδεσης της τροποποίησης H3K27ac, καθώς και η σημαντική αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης που παρατηρήθηκε στις TSS περιοχές όλων των ενεργά μεταγραφόμενων περιοχών, σε ένα εύρος 0-4 h μετά την ακτινοβολία (15 J/m²), δείχνουν πως η απόκτηση ή διατήρηση μιας ενεργούς διαμόρφωσης της χρωματίνης σε αντίστοιχες περιοχές, είναι σημαντική για την επιδιόρθωση του μεταγραφόμενου γονιδιώματος.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός πως τόσο στο επίπεδο οργάνωσης της χρωματίνης, όσο και στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, η κυτταρική απόκριση στην UV εξαρτάται από την δόση στην οποία εκτίθενται τα κύτταρα (Li and Ho 1998; Farrell et al. 2011). Για παράδειγμα, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως όταν εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού εκτέθηκαν σε υψηλή δόση UV (80 J/m²) παρατηρήθηκε μια εκτεταμένη αναδιοργάνωση της χρωματίνης τόσο σε επίπεδο προσβασιμότητας, όσο και σε επίπεδο τροποποιήσεων ιστονών (Schick et al. 2015). Φαίνεται λοιπόν πως όταν τα κύτταρα κληθούν να αντιμετωπίσουν μεγαλύτερο φορτίο βλαβών (υψηλότερες δόσεις UV, μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης), εφαρμόζουν δραστικές αλλαγές που σχετίζονται με ενεργοποίηση και εφαρμογή προγραμμάτων απόπτωσης, ώστε να περιοριστεί ο κίνδυνος κακοήθους μετασχηματισμού των κυττάρων αυτών. Τέτοιες αποφάσεις κυτταρικής μοίρας (cell fate decisions) επιτελούνται μέσω μεγάλων αλλαγών στην δομή της χρωματίνης και στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Αντίθετα, τα αποτελέσματά μας

δείχνουν πως οι ήπιες δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας ($8-20 \text{ J/m}^2$), δεν ωθούν το κύτταρο στην απόπτωση αλλά πυροδοτούν μηχανισμούς που στοχεύουν στην επιδιόρθωση των βλαβών.

Πρόσφατες έρευνες στο πεδίο της μεταγραφικής ρύθμισης και συγκεκριμένα εστιασμένες στη δυναμική της μεταγραφικής έναρξης και στην απόκριση στο θερμικό στρες, υποδεικνύουν πως η ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε κατάσταση παύσης (repressed genes) λαμβάνει χώρα μέσω μιας μετάβασης από την κατάσταση πρόωρου τερματισμού των Pol II-ηγο μορίων (λόγω της μεταγραφικής παύσης) στην κατάσταση της άμεσης προώθησης τους στην παραγωγική επιμήκυνση (Krebs et al. 2017). Τα παραπάνω υποδηλώνουν πως για την γρήγορη επαγωγή της γονιδιακής μεταγραφής προ-απαιτείται μια κατάσταση συνεχούς μεταγραφικής έναρξης. Στην περίπτωση της μεταγραφικής απόκρισης των κυττάρων μετά από έκθεση σε UV, παρατηρούμε την απελευθέρωση μεταγραφικών κυμάτων από τις PPP θέσεις, στα ενεργά γονίδια. Επιπροσθέτως, μια πρόσφατη μελέτη παρέχει δεδομένα που υποστηρίζουν πως η παύση της μεταγραφής στις θέσεις PPP, αναστέλλει τη μεταγραφική έναρξη, ενώ απελευθέρωση της Pol II από τις θέσεις PPP οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής έναρξης και των επιπέδων του nRNA (Fitz et al. 2018). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα ευρήματά μας δείχνουν πως η γενικευμένη απελευθέρωση των Pol II μορίων από τις PPP θέσεις και η αύξηση του σήματος του nRNA είναι αρκετή για να οδηγήσει σε *de novo* έναρξη της μεταγραφής και στρατολόγησης Pol II μορίων στις περιοχές συγκρότησης του PIC και ειδικότερα στα ενεργά TSSs των γονιδίων, των PROMPTs και των eTSSs. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, μπορούμε να πούμε πως τα αποτελέσματά μας είναι συμβατά και επεκτείνουν την ιδέα πως η συνεχής απελευθέρωση από τις PPP θέσεις και η επανέναρξη της μεταγραφής από τα μόρια Pol II που βρίσκονται προσδεδεμένα στους υποκινητές, αποτελούν ένα σημαντικό στοιχείο του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης (Steurer et al. 2018). Ταυτόχρονα, αναλογιζόμενοι i) ότι το CHIP-seq σήμα της Pol II στις περιοχές πλησίον του TSS εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής του μορίου στις γονιδιωματικές αυτές θέσεις (Ehrensberger et al. 2013), και ii) δεδομένης της γρήγορης προώθησης των Pol II μορίων από τη φάση μεταγραφικής έναρξης σε αυτήν της μεταγραφικής επιμήκυνσης που πραγματοποιείται μετά την έκθεση σε UV (Lavigne et al. 2017), καταλήγουμε πως τα παραπάνω εξηγούν το μειωμένο σήμα που εντοπίζεται για την Pol II ηγο στις TSS περιοχές, μετά την έκθεση σε UV. Αυτό είναι εμφανές και από τα CHIP-seq πειράματά μας που πραγματοποιήθηκαν παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής DRB (βλέπε Εικόνες 32-35). Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως η UV επαγόμενη μείωση του CHIP-seq Pol II-ηγο σήματος αναστέλλεται όταν παρεμποδίζεται η απελευθέρωση των Pol II μορίων από τις PPP θέσεις. Ακόμη, τα πειράματά μας έδειξαν πως τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε CS-B ινοβλάστες δέρματος, οι δυναμικές της μεταγραφικής έναρξης μετά από έκθεση σε UV διαμορφώνονται με παρόμοιο τρόπο, δείχνοντας πως το στάδιο της πρόσδεσης της Pol II στις περιοχές των υποκινητών και πιθανότητα η αρχική προώθηση των Pol II μορίων στην φάση παραγωγικής επιμήκυνσης πραγματοποιείται κανονικά στα CS-B κύτταρα, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια ανάκαμψης των κυττάρων μετά από έκθεση σε UV.

Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν πως η μεταγραφή διπλής κατεύθυνσης (bidirectional transcription) ξεκινά από δύο διακριτές θέσεις έναρξης της μεταγραφής (θέσεις συγκρότησης του PIC), που αντιστοιχούν σε μία περιοχή ελεύθερη από νουκλεοσώματα (Nucleosome Depleted Region, NDR) (Core et al. 2012; Lai and Pugh 2017; Ibrahim et al. 2018). Πράγματι, στα αμφίδρομα μεταγραφόμενα ενεργά γονίδια που κωδικοποιούν mRNA αλλά και στα ζεύγη mRNA-PROMPTs, η πρόσδεση της Pol II-ηγορο λαμβάνει χώρα στις δύο άκρες μιας υψηλά προσβάσιμης περιοχής της χρωματίνης (με βάση το ATAC-seq σήμα), που περιβάλλεται από H3K27ac νουκλεοσώματα (βλέπε κόκκινα βέλη στην Εικόνα 46). Τα παραπάνω συνάδουν με το γεγονός πως η δομή των PICs των γονιδίων που κωδικοποιούν mRNA παρουσιάζει κοινή οργάνωση με αυτών της μη κωδικής μεταγραφής (Lai and Pugh 2017). Γενικότερα, με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να υποστηρίξουμε πως οι διαφορές στα μεταγραφικά επίπεδα μεταξύ των διαφόρων ειδών μεταγράφων (γονίδια, PROMPTs, eRNAs) σε φυσιολογικές συνθήκες, δεν οφείλονται τόσο σε διαφορές ως προς την στρατολόγηση της Pol II-ηγορο και τη συγκρότηση του PIC, αλλά περισσότερο στον ρυθμό της μεταγραφικής έναρξης ή/και στον πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής αλλά και στην ευαισθησία που παρουσιάζουν τα μη κωδικά μετάγραφα στην αποικοδόμησή τους από το εξώσωμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η κατανομή του XR-seq σήματος στους νοηματικούς (sense) και αντινοηματικούς (antisense) κλώνους των mRNAs και PROMPTs των TSSs μονής κατεύθυνσης (unidirectional TSSs) και των ενισχυτών (Εικόνες 43-45), είναι πιο ομοιογενής από ότι θα προβλεπόταν με βάση το αντίστοιχο CAGE σήμα. Το εύρημα αυτό ενισχύει το ενδεχόμενο ενός μηχανισμού επιδιόρθωσης σε μεταγραφόμενους γονιδιωματικούς τόπους, ο οποίος βασίζεται και προωθείται από τα υψηλά επίπεδα Pol II-ηγορο που βρίσκονται στις PIC θέσεις σε συνθήκες σταθερής κατάστασης (Εικόνα 43b) και της γρήγορης και συνεχούς μετάβασης των μορίων αυτών στη φάση επιμήκυνσης μετά τη UV (Εικόνες 32-35). Σχετικά με τον ρόλο της αντινοηματικής μεταγραφής έχει προταθεί πως η διαδικασία της μεταγραφής αυτή κάθε αυτή, παρά τα ίδια τα μετάγραφα, εξυπηρετούν βιολογικές λειτουργίες (Murray and Mellor 2016). Για παράδειγμα, οι αλληλουχίες των PROMPTs μπορούν να λειτουργούν είτε ως πλατφόρμες πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση των αντίστοιχων σχετιζόμενων γονιδίων (Scruggs et al. 2015), είτε διάφορων πρωτεϊνών που προσδέονται στο RNA και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων (Seila et al. 2009). Γίνεται επομένως κατανοητό, πως η επιτυχής επιδιόρθωση των περιοχών αυτών, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διατήρηση αφενός των ορθών προγραμμάτων γονιδιωματικής έκφρασης, αφετέρου σημαντικών διαδικασιών απαραίτητων για την ομαλή κυτταρική ζωή.

Αντιπαραθέτοντας τα αποτελέσματά μας με δύο πρόσφατες μελέτες, οι οποίες ερευνούν το αποτέλεσμα της δράσης των επιδιορθωτικών μηχανισμών στο πρότυπο των σωματικών μεταλλαγών σε βιοψίες

καρκίνου, υποθέτουμε πως ο επιδιορθωτικός μηχανισμός που περιγράφουμε, μπορεί να ευθύνεται για το γεγονός πως διάφορες σημειακές μεταλλαγές φαίνεται να βρίσκονται σημαντικά μειωμένες σε περιοχές ανοδικά των TSS ή γύρω από περιοχές που δείχνουν υπερευαισθησία στην DNase (DNase hyper-sensitive sites, DHS) (Haradhvala et al. 2016; Perera et al. 2016; Sabarinathan et al. 2016).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν μια γενικευμένη, ελεγχόμενη από την μεταγραφή, κυτταρική απόκριση που ενεργοποιείται από το γενετοξικό στρες της UV ακτινοβολίας και στοχεύει στην επιδιόρθωση του μεταγραφόμενου γονιδιώματος (συμπεριλαμβανομένων γονιδίων, PROMPTs και ενεργών ενισχυτών) μέσω του μηχανισμού TC-NER, ανεξάρτητα από το πρότυπο έκφρασης του κάθε γονιδίου πριν την έκθεση σε UV ακτινοβολία ή από τις σχετικές θέσεις των βλαβών στο γονιδίωμα. Προτείνουμε ένα μοντέλο, στο οποίο η γρήγορη μετάβαση από την έναρξη της μεταγραφής στο στάδιο της επιμήκυνσης, επιταχύνει την επιδιόρθωση ολόκληρου του μεταγραφόμενου γονιδιώματος. Συνολικά τα αποτελέσματά μας, καταδεικνύουν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της προσβασιμότητας της χρωματίνης στις ενεργές ρυθμιστικές περιοχές, τις δυναμικές της μεταγραφής και την επιδιόρθωση μέσω του TC-NER, αποκαλύπτοντας την πολυπλοκότητα της κυτταρικής απόκρισης σε βλάβες που παρακωλύουν τη διαδικασία της μεταγραφής.

Σχετικά με την μελέτη των διαφορών στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ Vh10-htert (φυσιολογικών) και CS-B-htert ινοβλαστών τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν πως η παρουσία/απουσία της CS-B πρωτεΐνης επηρεάζει την έκφραση ενός αριθμού γονιδίων. Πρόσφατες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τον ρόλο της CSB πρωτεΐνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Newman et al. 2006; Wang et al. 2014; Boetefuer et al. 2018). Ωστόσο, οι έρευνες αυτές εμφανίζουν περιορισμούς, οι οποίοι οφείλονται στην χρησιμοποίηση RNA μικροσυστοιχιών για την ποσοτική μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης και οι οποίες εμφανίζουν μικρότερη ευαισθησία από την RNA-seq μέθοδο (Lowe et al. 2017), αλλά και στην χρησιμοποίηση των Simian Virus (SV)-40 αθανατοποιημένων CS-B ινοβλαστών, δεδομένου πως η αθανατοποίηση μέσω του SV40 ιού διαταράσσει περισσότερο τη φυσιολογία του κυττάρου σε σχέση με την αντίστοιχη htert (Tououli et al. 2002). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως πολλά από τα γονίδια που φαίνονται να υπερεκφράζονται στα CSB κύτταρα, αφορούν διαδικασίες που σχετίζονται με ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Αντίθετα, τα γονίδια που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στα CS-B κύτταρα φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με την ανοσολογική απόκριση και την φλεγμονή.

Η σύγκριση των ChIP-seq H3K27me3 πειραμάτων μεταξύ φυσιολογικών και CS-B κυττάρων, υποδηλώνει μια πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης CSB με έμμεσο ή άμεσο τρόπο, σε επιγενετικές διαδικασίες (στη συγκεκριμένη περίπτωση μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών) που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Μάλιστα, φαίνεται πως πολλές από τις διαφορές στο πρότυπο του H3K27me3 μεταξύ Vh10 και CS-B κυττάρων αφορούν γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση, τα οποία

ανήκουν επίσης στα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (Differentially Expressed Genes, DEGs) μεταξύ των 2 κυτταρικών σειρών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την διαφορική έκφραση και στόχευση με H3K27me3 των συστοιχιών των *HOX* γονιδίων, μεταξύ φυσιολογικών και CS-B ινοβλαστών δέρματος. Τα *HOX* γονίδια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνών καθώς αποτελούν συστοιχίες γονιδίων (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* και *HOXD* clusters), οι οποίες εμφανίζουν διακριτό χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης κατά την ανάπτυξη (Mallo and Alonso 2013), όπου ενεργοποιούνται σε καθορισμένα χρονικά «παράθυρα». Ακόμη, έχει βρεθεί πως, σε διαφοροποιημένα κύτταρα, τα *HOX* γονίδια βρίσκονται κατεσταλμένα και στοχευμένα με την τροποποίηση H3K27me3 (Bernstein et al. 2006). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν υπερέκφραση συγκεκριμένων γονιδίων *HOX* σε CS-B και CS-A πρωτογενείς ινοβλάστες δέρματος και ταυτόχρονα μη ομαλή στόχευσή τους από το PRC2 και την τροποποίηση H3K27me3 (Βλέπε Αποτελέσματα 5.9). Τα ευρήματα αυτά μοιάζουν αρκετά με αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί σε κυτταρικές σειρές σαρκώματος Ewing (καρκίνος οστών και μαλακών μορίων) (Patel et al. 2012; Svoboda et al. 2014) και έχουν αποδοθεί σε μη ορθή επιγενετική ρύθμιση κατά την ανάπτυξη των κυττάρων. Γενικότερα, η υπερέκφραση εμβρυικών πρωτεϊνών έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο, ωστόσο δεν έχουν αναφερθεί CS ασθενείς που εμφανίζουν κακοήθειες. Αναλογιζόμενοι τις αναπτυξιακές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν το CS, θα μπορούσε να υποτεθεί πως η παρουσία της CSB πρωτεΐνης είναι κρίσιμη για την ρύθμιση της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδιωματικών περιοχών, η οποία επιτυγχάνεται πιθανώς μέσω της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης της CSB με ένζυμα τροποποιητές της χρωματίνης. Μάλιστα, πρόσφατες σχετικά μελέτες έδειξαν πως η CSB πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τη χρωματίνη, όπως η αποακετυλάση HDAC1 (Nicolai et al. 2015; Boeing et al. 2016). Ειδικότερα για τις γονιδιωματικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από H3K27me3 έχει βρεθεί, αλλά όχι περαιτέρω αποσαφηνιστεί, ότι η CSB σχετίζεται με την μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K27me3, καθώς CHIP-seq πειράματα έναντι της CSB έδειξαν πως εκτός από υποκινητές και ενισχυτές, η πρωτεΐνη προσδένεται και σε γονιδιωματικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από την H3K27me3 (Lake et al. 2014). Τα παραπάνω δεδομένα συνδέουν τη CSB όχι μόνο με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση, αλλά και με την επιγενετική στόχευσή τους. Το πώς επιτυγχάνεται η ειδίκευση στη ρύθμιση των περιοχών αυτών αλλά και μέσω ποιων αλληλεπιδράσεων καθορίζεται το παραπάνω πρότυπο έκφρασης και επιγενετικής ρύθμισης, αναμένεται να αναδείξει πρωτεΐνες και μονοπάτια καθοριστικά για την αποσαφήνιση μέρους των αναπτυξιακών ανωμαλιών που αποτελούν χαρακτηριστικά του CS.

7 Βιβλιογραφία

- Adar S, Hu J, Lieb JD, Sancar A (2016) Genome-wide kinetics of DNA excision repair in relation to chromatin state and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1603388113>
- Allfrey V, Faulkner R, Mirsky A (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. ... *Sci United States ...* 315:786–794.
<https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Andersson R, Chen Y, Core L, et al (2015) Human Gene Promoters Are Intrinsically Bidirectional. *Mol. Cell*
- Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, et al (2014a) An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12787>
- Andersson R, Refsing Andersen P, Valen E, et al (2014b) Nuclear stability and transcriptional directionality separate functionally distinct RNA species. *Nat Commun*.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6336>
- Andrade-Lima LC, Veloso A, Paulsen MT, et al (2015) DNA repair and recovery of RNA synthesis following exposure to ultraviolet light are delayed in long genes. *Nucleic Acids Res* 43:2744–2756.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv148>
- Anindya R, Aygün O, Svejstrup JQ (2007) Damage-Induced Ubiquitylation of Human RNA Polymerase II by the Ubiquitin Ligase Nedd4, but Not Cockayne Syndrome Proteins or BRCA1. *Mol Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.008>
- Arlett CF, Green MHL, Rogers PB, et al (2008) Minimal ionizing radiation sensitivity in a large cohort of xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Br J Radiol*. <https://doi.org/10.1259/bjr/27072321>
- Bataille AR, Jeronimo C, Jacques PÉ, et al (2012) A Universal RNA Polymerase II CTD Cycle Is Orchestrated by Complex Interplays between Kinase, Phosphatase, and Isomerase Enzymes along Genes. *Mol Cell* 45:158–170. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.024>
- Beltran M, Yates CM, Skalska L, et al (2016) The interaction of PRC2 with RNA or chromatin is mutually antagonistic. *Genome Res*. <https://doi.org/10.1101/gr.197632.115>
- Bentley DL (2014) Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.* 15:163–175
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, et al (2006) A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Birger Y, West KL, Postnikov Y V., et al (2003) Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin. *EMBO J* 22:1665–1675. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg142>
- Blackledge NP, Rose NR, Klose RJ (2015) Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: Modifications to a complex story. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm4067>
- Boeing S, Williamson L, Encheva V, et al (2016) Multiomic Analysis of the UV-Induced DNA Damage Response. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.047>
- Boetefuer EL, Lake RJ, Fan HY (2018) Mechanistic insights into the regulation of transcription and transcription-coupled DNA repair by Cockayne syndrome protein B. *Nucleic Acids Res*.
- Borisova ME, Voigt A, Tollenaere MAX, et al (2018) P38-MK2 signaling axis regulates RNA metabolism

after UV-light-induced DNA damage. *Nat Commun* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03417-3>

- Bregman DB, Halaban R, van Gool AJ, et al (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11586>
- Brooks PJ (2013) Blinded by the UV light: How the focus on transcription-coupled NER has distracted from understanding the mechanisms of Cockayne syndrome neurologic disease. *DNA Repair (Amst)*. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.018>
- Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, et al (2013) Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
- Buenrostro JD, Wu B, Chang HY, Greenleaf WJ (2015) ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Curr Protoc Mol Biol*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2129s109>
- Bugai A, Quaresma AJC, Friedel CC, et al (2019) P-TEFb Activation by RBM7 Shapes a Pro-survival Transcriptional Response to Genotoxic Stress. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.033>
- Chen R, Liu M, Li H, et al (2008) PP2B and PP1 α cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺-signaling. *Genes Dev* 22:1356–1368. <https://doi.org/10.1101/gad.1636008>
- Chen Y, Pai AA, Herudek J, et al (2016) Principles for RNA metabolism and alternative transcription initiation within closely spaced promoters. *Nat Genet*. <https://doi.org/10.1038/ng.3616>
- Chiou YY, Hu J, Sancar A, Selby CP (2018) RNA polymerase II is released from the DNA template during transcription-coupled repair in mammalian cells. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000971>
- Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* 40:179–204
- Cifuentes-Rojas C, Hernandez AJ, Sarma K, Lee JT (2014) Regulatory Interactions between RNA and Polycomb Repressive Complex 2. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.009>
- Cinghu S, Yang P, Kosak JP, et al (2017) Intragenic Enhancers Attenuate Host Gene Expression. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.010>
- Citterio E, Van Den Boom V, Schnitzler G, et al (2000) ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol* 20:7643–7653. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.20.7643-7653.2000>
- Cockayne EA (1936) Dwarfism with retinal atrophy and deafness. *Arch Dis Child* 11:1–8. <https://doi.org/10.1136/adc.11.61.1>
- Compe E, Egly JM (2012) TFIIH: When transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 13:343–354
- Corces MR, Trevino AE, Hamilton EG, et al (2017) An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nat Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4396>
- Core LJ, Martins AL, Danko CG, et al (2014) Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of

initiation regions at mammalian promoters and enhancers. *Nat Genet.*
<https://doi.org/10.1038/ng.3142>

Core LJ, Waterfall JJ, Gilchrist DA, et al (2012) Defining the Status of RNA Polymerase at Promoters. *Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.034>

Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT (2008) Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1162228>

Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, et al (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci.*
<https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>

Datta A, Bagchi S, Nag A, et al (2001) The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res - DNA Repair* 486:89–97. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00082-9)

Davidovich C, Zheng L, Goodrich KJ, Cech TR (2013) Promiscuous RNA binding by Polycomb repressive complex 2. *Nat Struct Mol Biol.* <https://doi.org/10.1038/nsmb.2679>

Davie K, Jacobs J, Atkins M, et al (2015) Discovery of transcription factors and regulatory regions driving in vivo tumor development by ATAC-seq and FAIRE-seq open chromatin profiling. *PLoS Genet* 11:e1004994. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004994>

de la Torre-Ubieta L, Stein JL, Won H, et al (2018) The Dynamic Landscape of Open Chromatin during Human Cortical Neurogenesis. *Cell*

de Santa F, Barozzi I, Mietton F, et al (2010) A large fraction of extragenic RNA Pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000384>

Di Croce L, Helin K (2013a) Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol* 20:1147–1155. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2669>

Di Croce L, Helin K (2013b) Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

Dinant C, Ampatzidis-Michailidis G, Lans H, et al (2013) Enhanced chromatin dynamics by fact promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage. *Mol Cell* 51:469–479.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.007>

Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489:101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>

Donahue BA, Yin S, Taylor JS, et al (1994) Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8502–6.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8502>

Egloff S, Dienstbier M, Murphy S (2012) Updating the RNA polymerase CTD code: Adding gene-specific layers. *Trends Genet.* 28:333–341

Ehrensberger AH, Kelly GP, Svejstrup JQ (2013) XMechanistic interpretation of promoter-proximal peaks and RNAPII density maps. *Cell*

ENCODE, Bernstein BE, Birney E, et al (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* <https://doi.org/nature11247> [pii]\n10.1038/nature11247

Epanchintsev A, Costanzo F, Rauschendorf MA, et al (2017) Cockayne's Syndrome A and B Proteins

- Regulate Transcription Arrest after Genotoxic Stress by Promoting ATF3 Degradation. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.009>
- Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, et al (2016) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1351>
- Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG (2011) Chromatin structure following UV-induced DNA damage-repair or death? *Int. J. Mol. Sci*.
- Fassihi H, Sethi M, Fawcett H, et al (2016) Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proc Natl Acad Sci* 113:E1236–E1245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519444113>
- Fitz J, Neumann T, Pavri R (2018) Regulation of RNA polymerase II processivity by Spt5 is restricted to a narrow window during elongation. *EMBO J*. <https://doi.org/10.15252/embj.201797965>
- Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LHF (2006a) Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. *Mol Cell* 23:471–482. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.029>
- Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LHF (2006b) Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.029>
- García-Muse T, Aguilera A (2016) Transcription-replication conflicts: How they occur and how they are resolved. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:553–563. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.88>
- Garinis GA, Uittenboogaard LM, Stachelscheid H, et al (2009) Persistent transcription-blocking DNA lesions trigger somatic growth attenuation associated with longevity. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/ncb1866>
- Gilchrist DA, Nechaev S, Lee C, et al (2008) NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev* 22:1921–1933. <https://doi.org/10.1101/gad.1643208>
- Gillet LCJ, Schärer OD (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 106:253–276
- Gray LT, Yao Z, Nguyen TN, et al (2017) Layer-specific chromatin accessibility landscapes reveal regulatory networks in adult mouse visual cortex. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/elife.21883>
- Green CM, Almouzni G (2002) When repair meets chromatin. *First in series on chromatin dynamics*. *EMBO Rep.* 3:28–33
- Gross D (1988) Nuclease Hypersensitive Sites In Chromatin. *Annu Rev Biochem* 57:159–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.57.1.159>
- Guo R, Chen J, Mitchell DL, Johnson DG (2011) GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res* 39:1390–1397. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq983>
- Gyenis Á, Umlauf D, Újfaludi Z, et al (2014) UVB Induces a Genome-Wide Acting Negative Regulatory Mechanism That Operates at the Level of Transcription Initiation in Human Cells. *PLoS Genet* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004483>

- Hahn S (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:394–403
- Hanawalt PC, Spivak G (2008a) Transcription-coupled DNA repair: Two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Hanawalt PC, Spivak G (2008b) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:958–70. <https://doi.org/10.1038/nrm2549>
- Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, et al (2016) Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.050>
- Harreman MM, Taschner MM, Sigurdsson SS, et al (2009) Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *PNAS*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907052106>
- Hauer MH, Gasser SM (2017) Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev.*
- Heidemann M, Hintermair C, Vo?? K, Eick D (2013) Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829:55–62
- Heine GF, Horwitz AA, Parvin JD (2008) Multiple mechanisms contribute to inhibit transcription in response to DNA damage. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707700200>
- Henning K a, Li L, Iyer N, et al (1995) The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 82:555–64. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90028-4)
- Henriques T, Scruggs BS, Inouye MO, et al (2018) Widespread transcriptional pausing and elongation control at enhancers. *Genes Dev*. <https://doi.org/10.1101/gad.309351.117>
- Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366–374
- Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, et al (2004) From The Cover: Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 101:15410–15415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404587101>
- Hosogane M, Funayama R, Nishida Y, et al (2013) Ras-Induced Changes in H3K27me3 Occur after Those in Transcriptional Activity. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003698>
- Hosogane M, Funayama R, Shirota M, Nakayama K (2016) Lack of Transcription Triggers H3K27me3 Accumulation in the Gene Body. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.034>
- Hu J, Adar S, Selby CP, et al (2015) Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution. *Genes Dev*. <https://doi.org/10.1101/gad.261271.115>
- Ibrahim MM, Karabacak A, Glaes A, et al (2018) Determinants of promoter and enhancer transcription directionality in metazoans. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06962-z>
- Itoh T, Ono T, Yamaizumi M (1994) A new UV-sensitive syndrome not belonging to any complementation groups of xeroderma pigmentosum or Cockayne syndrome: siblings showing biochemical characteristics of Cockayne syndrome without typical clinical manifestations. *Mutat Res Repair* 314:233–248. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0921-8777(94)90068-X)
- Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM (2016) DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective.

Nat. Rev. Cancer 16:35–42

- Jensen A, Mullenders LHF (2010) Transcription factor IIS impacts UV-inhibited transcription. *DNA Repair (Amst)*. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.08.002>
- John S, Sabo PJ, Thurman RE, et al (2011) Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.* 43:264–268
- Jonkers I, Kwak H, Lis JT (2014) Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife* 2014:.. <https://doi.org/10.7554/eLife.02407>
- Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS (2013) Histone H4 Lysine 20 methylation: Key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 41:2797–2806
- Kaneko S, Son J, Bonasio R, et al (2014) Nascent RNA interaction keeps PRC2 activity poised and in check. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.247940.114>
- Karikkineth AC, Scheibye-Knudsen M, Fivenson E, et al (2017) Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Ageing Res. Rev.* 33:3–17
- Karlic R, Chung H-R, Lasserre J, et al (2010) Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268:10416–10424
- Kim H, Erickson B, Luo W, et al (2010) Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nat Struct Mol Biol* 17:1279–1286. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1913>
- Kim SK, Jung I, Lee H, et al (2012) Human histone H3K79 methyltransferase DOT1L methyltransferase binds actively transcribing RNA polymerase II to regulate gene expression. *J Biol Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384057>
- Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, et al (2008) Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* 7:744–750. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.01.014>
- Koch F, Fenouil R, Gut M, et al (2011) Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nat Struct Mol Biol.* <https://doi.org/10.1038/nsmb.2085>
- Kolman A, Bohušová T (1992) Induction of 6-thioguanine-resistant mutants in human diploid fibroblasts in vitro with ethylene oxide. *Mutat Res Mutagen Relat Subj.* [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)91225-g](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)91225-g)
- Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14:2452–2460. <https://doi.org/10.1101/gad.824700>
- Kouskouti A, Talianidis I (2005) Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO J* 24:347–357. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600516>
- Kouzarides T (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128:693–705
- Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, et al (2007) Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: A complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 145:1388–1396

- Krebs AR, Imanci D, Hoerner L, et al (2017) Genome-wide Single-Molecule Footprinting Reveals High RNA Polymerase II Turnover at Paused Promoters. *Mol Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.027>
- Kristensen U, Epanchintsev A, Rauschendorf MA, et al (2013) Regulatory interplay of Cockayne syndrome B ATPase and stress-response gene ATF3 following genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220071110>
- Lai WKM, Pugh BF (2017) Genome-wide uniformity of human “open” pre-initiation complexes. *Genome Res*. <https://doi.org/10.1101/gr.210955.116>
- Lake RJ, Boetefuer EL, Tsai PF, et al (2014) The Sequence-Specific Transcription Factor c-Jun Targets Cockayne Syndrome Protein B to Regulate Transcription and Chromatin Structure. *PLoS Genet*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004284>
- Laugel V, Daloz C, Durand M, et al (2010) Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum. Mutat*. 31:113–126
- Lavigne MD, Konstantopoulos D, Ntakou-Zamplara KZ, et al (2017) Global unleashing of transcription elongation waves in response to genotoxic stress restricts somatic mutation rate. *Nat Commun* 8:
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02145-4>
- Lee KM, Choi KH, Ouellette MM (2004) Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-004-5123-3>
- Lehmann AR (1982) Three complementation groups in Cockayne syndrome. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 106:347–356. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90115-4](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90115-4)
- Lewis EB (1978) A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila* BT - Genes, Development and Cancer. *Nature*
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128:707–719
- Li D, Liu J, Yang X, et al (2017) Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming. *Cell Stem Cell* 21:819–833.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.10.012>
- Li G, Ho VC (1998) p53-Dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02305.x>
- Li W, Notani D, Rosenfeld MG (2016) Enhancers as non-coding RNA transcription units: Recent insights and future perspectives. *Nat. Rev. Genet*.
- Liakos A, Lavigne MD, Fousteri M (2017) Nucleotide excision repair: From neurodegeneration to cancer. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp 17–39
- Lombardi PM, Cole KE, Dowling DP, Christianson DW (2011) Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol*.
- Lowe R, Shirley N, Bleackley M, et al (2017) Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, et al (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Maezawa S, Yukawa M, Alavattam KG, et al (2017) Dynamic reorganization of open chromatin underlies diverse transcriptomes during spermatogenesis. *Nucleic Acids Res*.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1052>

- Magnuson B, Veloso A, Kirkconnell KS, et al (2015) Identifying transcription start sites and active enhancer elements using BruUV-seq. *Sci Rep* 5:1–12. <https://doi.org/10.1038/srep17978>
- Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, et al (2016) Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol Cell* 62:63–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.025>
- Mallo M, Alonso CR (2013) The regulation of Hox gene expression during animal development. *Dev.*
- Margueron R, Reinberg D (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469:343–349
- Marietta C, Brooks PJ (2007) Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells. *EMBO Rep.* <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400932>
- Marmorstein R, Zhou MM (2014) Writers and readers of histone acetylation: Structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ (2014) Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>
- Martinez E, Palhan VB, Tjernberg a, et al (2001) Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* 21:6782–6795. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6782-6795.2001>
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, et al (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 399:700–704. <https://doi.org/10.1038/21447>
- Mayer A, Lidschreiber M, Siebert M, et al (2010) Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol* 17:1272–1278. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1903>
- Mayne L, Lehmann AR (1982) Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: An early defect in cells from individuals with Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Mutat Res* 96:140. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90047-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90047-1)
- Meng H, Bartholomew B (2018) Emerging roles of transcriptional enhancers in chromatin looping and promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*
- Moser J, Kool H, Giakzidis I, et al (2007) Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1 and DNA Ligase III?? in a Cell-Cycle-Specific Manner. *Mol Cell* 27:311–323. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.014>
- Mueller B, Mieczkowski J, Kundu S, et al (2017) Widespread changes in nucleosome accessibility without changes in nucleosome occupancy during a rapid transcriptional induction. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.293118.116>
- Murray SC, Mellor J (2016) Using both strands: The fundamental nature of antisense transcription. *Bioarchitecture*
- Murtha M, Strino F, Tokcaer-Keskin Z, et al (2015) Comparative FAIRE-seq analysis reveals distinguishing features of the chromatin structure of ground state- and primed-pluripotent cells. *Stem Cells* 33:378–391. <https://doi.org/10.1002/stem.1871>
- Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, et al (2012) Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat*

Genet 44:586–592. <https://doi.org/10.1038/ng.2229>

- Nance MA, Berry SA (1992) Cockayne Syndrome: Review of 140 cases. *Am J Med Genet* 42:68–84. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320420115>
- Nardo T, Oneda R, Spivak G, et al (2009a) A UV-sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 106:6209–6214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902113106>
- Nardo T, Oneda R, Spivak G, et al (2009b) A UV-sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6209–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902113106>
- Newman JC, Bailey AD, Weiner AM (2006) Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510909103>
- Nguyen AT, Zhang Y (2011) The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev.* 25:1345–1358
- Nicolai S, Filippi S, Caputo M, et al (2015) Identification of Novel Proteins Co-Purifying with Cockayne Syndrome Group B (CSB) Reveals Potential Roles for CSB in RNA Metabolism and Chromatin Dynamics. *PLoS One* 10:e0128558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128558>
- Nilson KA, Lawson CK, Mullen NJ, et al (2017) Oxidative stress rapidly stabilizes promoter-proximal paused Pol II across the human genome. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkx724>
- Ntini E, Järvelin AI, Bornholdt J, et al (2013) Polyadenylation site-induced decay of upstream transcripts enforces promoter directionality. *Nat Struct Mol Biol.* <https://doi.org/10.1038/nsmb.2640>
- Ogi T, Limsirichaikul S, Overmeer RM, et al (2010) Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells. *Mol Cell* 37:714–727. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.009>
- Oh KS, Khan SG, Jaspers NGJ, et al (2006) Phenotypic heterogeneity in the XPB DNA helicase gene (ERCC3): Xeroderma pigmentosum without and with Cockayne syndrome. *Hum Mutat* 27:1092–1103. <https://doi.org/10.1002/humu.20392>
- Oksenysh V, Zhovmer A, Ziani S, et al (2013) Histone Methyltransferase DOT1L Drives Recovery of Gene Expression after a Genotoxic Attack. *PLoS Genet* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003611>
- Patel M, Simon JM, Iglesia MD, et al (2012) Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription. *Genome Res.* <https://doi.org/10.1101/gr.125666.111>
- Pengelly AR, Copur Ö, Jäckle H, et al (2013) A histone mutant reproduces the phenotype caused by loss of histone-modifying factor polycomb. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1231382>
- Perera D, Poulos RC, Shah A, et al (2016) Differential DNA repair underlies mutation hotspots at active promoters in cancer genomes. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/nature17437>
- Pines A, Vrouwe MG, Marteijs JA, et al (2012) PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J Cell Biol* 199:235–249. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112132>
- Pogo BG, Allfrey VG, Mirsky AE (1966) RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene

activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:805–12.
<https://doi.org/10.1073/pnas.55.4.805>

- Preker P, Nielsen J, Kammler S, et al (2008) RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1164096>
- Proietti-De-Santis L, Drané P, Egly JM (2006) Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601071>
- Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, et al (2011) A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09692>
- Rapić-Otrin V, McLenigan MP, Bisi DC, et al (2002) Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 30:2588–2598. <https://doi.org/10.1093/nar/30.11.2588>
- Rapin I (2013) Disorders of nucleotide excision repair. *Handb Clin Neurol* 113:1637–1650.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00032-0>
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, et al (2010) Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids* 2010:1–32. <https://doi.org/10.4061/2010/592980>
- Riising EM, Comet I, Leblanc B, et al (2014) Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG Islands genome wide. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.005>
- Rockx DA, Mason R, van Hoffen A, et al (2000) UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10503–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.180169797>
- Sabarinathan R, Mularoni L, Deu-Pons J, et al (2016) Nucleotide excision repair is impaired by binding of transcription factors to DNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature17661>
- Scelfo A, Piunti A, Pasini D (2015) The controversial role of the Polycomb group proteins in transcription and cancer: How much do we not understand Polycomb proteins? *FEBS J*.
<https://doi.org/10.1111/febs.13112>
- Schick S, Fournier D, Thakurela S, et al (2015) Dynamics of chromatin accessibility and epigenetic state in response to UV damage. *J Cell Sci* 128:4380–4394. <https://doi.org/10.1242/jcs.173633>
- Schwertman P, Lagarou A, Dekkers DHW, et al (2012) UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat Genet* 44:598–602.
<https://doi.org/10.1038/ng.2230>
- Scruggs BS, Gilchrist DA, Nechaev S, et al (2015) Bidirectional Transcription Arises from Two Distinct Hubs of Transcription Factor Binding and Active Chromatin. *Mol Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.006>
- Seila AC, Core LJ, Lis JT, Sharp PA (2009) Divergent transcription: A new feature of active promoters. *Cell Cycle*
- Selby CP, Drapkin R, Reinberg D, Sancar A (1997) RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: Footprint and effect on excision repair. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/25.4.787>
- Shlyueva D, Stampfel G, Stark A (2014) Transcriptional enhancers: From properties to genome-wide predictions. *Nat. Rev. Genet*.

- Sigurdsson S, Dirac-Svejstrup AB, Svejstrup JQ (2010) Evidence that Transcript Cleavage Is Essential for RNA Polymerase II Transcription and Cell Viability. *Mol Cell* 38:202–210. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.026>
- Simon JA, Kingston RE (2013) Occupying Chromatin: Polycomb Mechanisms for Getting to Genomic Targets, Stopping Transcriptional Traffic, and Staying Put. *Mol. Cell*
- Sims RJ, Rojas LA, Beck D, et al (2011) The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* 332:99–103. <https://doi.org/10.1126/science.1202663>
- Smolle M, Workman JL (2013) Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829:84–97
- Staresincic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, et al (2009) Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J* 28:1111–1120. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.49>
- Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, et al (2014) Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13714>
- Steger DJ, Lefterova MI, Ying L, et al (2008) DOT1L/KMT4 Recruitment and H3K79 Methylation Are Ubiquitously Coupled with Gene Transcription in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1128/mcb.02076-07>
- Steurer B, Janssens RC, Geverts B, et al (2018) Live-cell analysis of endogenous GFP-RPB1 uncovers rapid turnover of initiating and promoter-paused RNA Polymerase II. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717920115>
- Svoboda LK, Harris A, Bailey NJ, et al (2014) Overexpression of HOX genes is prevalent in Ewing sarcoma and is associated with altered epigenetic regulation of developmental transcription programs. *Epigenetics*. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.988048>
- Tanaka K, Kawai K, Kumahara Y, et al (1981) Genetic complementation groups in Cockayne syndrome. *Somatic Cell Genet* 7:445–455. <https://doi.org/10.1007/BF01542989>
- Tantin D, Kansal A, Carey M (1997) Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.12.6803>
- Tie F, Banerjee R, Stratton CA, et al (2009) CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.037127>
- Tietjen JR, Zhang DW, Rodríguez-Molina JB, et al (2010) Chemical-genomic dissection of the CTD code. *Nat Struct Mol Biol* 17:1154–1161. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1900>
- Toouli CD, Huschtscha LI, Neumann AA, et al (2002) Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 t-antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205014>
- Tornaletti S, Reines D, Hanawalt PC (1999) Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24124>
- Troelstra C, Landsvater RM, Wiegant J, et al (1992a) Localization of the nucleotide excision repair gene ERCC6 to human chromosome 10q11-q21. *Genomics* 12:745–749. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90304-B](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90304-B)

- Troelstra C, van Gool A, de Wit J, et al (1992b) ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71:939–953. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90390-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90390-X)
- Tsompana M, Buck MJ (2014) Chromatin accessibility: A window into the genome. *Epigenetics and Chromatin* 7
- Ucar D, Márquez EJ, Chung C-H, et al (2017) The chromatin accessibility signature of human immune aging stems from CD8 + T cells . *J Exp Med*. <https://doi.org/10.1084/jem.20170416>
- Veloso A, Kirkconnell KS, Magnuson B, et al (2014) Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res* 24:896–905. <https://doi.org/10.1101/gr.171405.113>
- Vermeulen W, Fousteri M (2013a) Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012625>
- Vermeulen W, Fousteri M (2013b) Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012625>
- Vingron M, Vlahovicek K, Lasserre J, et al (2010) Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>
- Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, et al (1998) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12:343–356. <https://doi.org/10.1101/gad.12.3.343>
- Walmacq C, Cheung ACM, Kireeva ML, et al (2012) Mechanism of Translesion Transcription by RNA Polymerase II and Its Role in Cellular Resistance to DNA Damage. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.006>
- Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Deliv* 4:307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
- Wang QE, Han C, Zhao R, et al (2013) P38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 41:1722–1733. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1312>
- Wang Y, Chakravarty P, Raney M, et al (2014) Dysregulation of gene expression as a cause of cockayne syndrome neurological disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412569111>
- Wapinski OL, Lee QY, Chen AC, et al (2017) Rapid Chromatin Switch in the Direct Reprogramming of Fibroblasts to Neurons. *Cell Rep* 20:3236–3247. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.011>
- Williams LH, Fromm G, Gokey NG, et al (2015) Pausing of RNA Polymerase II Regulates Mammalian Developmental Potential through Control of Signaling Networks. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.003>
- Williamson L, Saponaro M, Boeing S, et al (2017) UV Irradiation Induces a Non-coding RNA that Functionally Opposes the Protein Encoded by the Same Gene. *Cell* 168:843–855.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.019>
- Wood K, Tellier M, Murphy S (2018) DOT1L and H3K79 methylation in transcription and genomic stability. *Biomolecules*

- Woudstra EC, Gilbert C, Fellows J, et al (2002) A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/415929a>
- Yasukawa T, Kamura T, Kitajima S, et al (2008) Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *EMBO J*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.249>
- Zentner GE, Henikoff S (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:259–266
- Zhang X, Horibata K, Saijo M, et al (2012) Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet* 44:593–597. <https://doi.org/10.1038/ng.2228>

Βιογραφικό Σημείωμα

Αναστάσιος Λιάκος

Υπηκοότητα: Ελληνική
Ημερομηνία γέννησης: 3 Απριλίου 1987
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμος
Στρατιωτική θητεία: Εκπληρωμένη (Μάιος 2018-Φεβρουάριος 2019)
Διεύθυνση: Πλαπούτα 50, Ελληνικό, Αθήνα, 167 77, Ελλάδα
E-mail: liakos@fleming.gr

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

2013-σήμερα: Υποψήφιος Διδάκτορας

«Μελέτη του ρόλου επιγενετικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης»
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

2011-2012: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα στην Ιατρική Γενετική (MSc Medical Genetics)

Βαθμός: “Άριστα”

School of Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Scotland, United Kingdom

2005-2011: Πτυχίο Βιολογίας

Βαθμός: 6,93/10 “Άιαν Καλώς”

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ερευνητική Εμπειρία:

Μάιος 2013 - σήμερα: Διδακτορική διατριβή

«Μελέτη του ρόλου επιγενετικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης»: Μελέτη της αναδιοργάνωσης της μεταγραφής και της χρωματίνης, ως απόκριση στο γενοτοξικό στρες. Εφαρμογή τεχνικών αλληλούχησης νέας γενιάς (ChIP-seq, ATAC-seq) σε συνδυασμό με βασικές τεχνικές κυτταρικής και μοριακής βιολογίας.

Επιβλέπουσα: Δρ Μαρία Φουστέρη, Ερευνήτρια Β’

Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», Ινστιτούτο Βασικής Βιοϊατρικής Έρευνας, Βάρη, Αθήνα, Ελλάδα

Ιούλιος 2018 – Φεβρουάριος 2019: Στρατιωτικό επιστημονικό προσωπικό

Μέλος του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας των Ενόπλων δυνάμεων, ως μέρος της στρατιωτικής θητείας. Συμμετοχή στη διαδικασία ταυτοποίησης πεσόντων Ελληνο-Ιταλικού πολέμου, μέσω αλληλούχησης υπερμεταβλητών περιοχών του μιτοχονδριακού DNA, από δείγματα αίματος και οστού.

Διευθυντής: Δρ Παναγιώτης Μενούκος

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Ενόπλων Δυνάμεων, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Ελλάδα

Ιούνιος 2012 - Αύγουστος 2012: Διπλωματική εργασία μεταπτυχιακού

“RNA splicing analyses for *BRCA1* and *BRCA2* gene variants”: Διερεύνηση πιθανών προβλημάτων κατά τη συρραφή του mRNA των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*, σε δύο ασθενείς καρκίνου που φέρουν μεταλλάξεις στα αντίστοιχα γονίδια. Εφαρμογή τεχνικών αντίστροφης μεταγραφής, PCR και αλληλούχησης DNA.

Επιβλέπων: Δρ Edward S. Tobias, Καθηγητής

The Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics, Glasgow, United Kingdom

Ιανουάριος 2011 - Ιούνιος 2011: Εθελοντική μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία

“Μελέτη του ομο- και ετερο-διμερισμού των πρωτεϊνών Homer”:
Μελέτη των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας Homer. Χρήση παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών με κατάλληλα σχεδιασμένους φορείς κλωνοποίησης, σε συνδυασμό με τις τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών και Western Blot.

Επιβλέπων: Δρ. Σπύρος Ευθυμιόπουλος, Καθηγητής

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Οκτώβρης 2009 - Ιανουάριος 2011: Διπλωματική εργασία πτυχίου

“Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών APP και Homer”:
Χρήση τεχνικών μοριακής κλωνοποίησης σε συνδυασμό με την μέθοδο δύο υβριδίων σε σακχαρομύκητα, με σκοπό τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών APP και Homer, οι οποίες εμπλέκονται στη νόσο Alzheimer.

Επιβλέπων: Δρ. Σπύρος Ευθυμιόπουλος, Καθηγητής

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Άλλες δεξιότητες:

Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής – 1^ο Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων, 5 Δεκεμβρίου 2013, Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα

Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα του «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» «Επισκέψεις Σχολείων» – Επίδειξη των εργαστηριακών εγκαταστάσεων και μικρές παρουσιάσεις σε μαθητές Λυκείου.

Επίβλεψη νεαρών επιστημόνων – Εξοικείωση προπτυχιακών και μεταπτυχιακών φοιτητών με τις τεχνικές του εργαστηρίου. Επίβλεψη και συνεργασία, σε μικρές ερευνητικές εργασίες.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Liakos A, Konstantopoulos D, Lavigne MD, Fousteri M (2020) Continuous transcription initiation guarantees robust repair of all transcribed genes and regulatory regions. *Nature Communications* 11:916. DOI: 10.1038/s41467-020-14566-9

Lavigne MD, Konstantopoulos D, Ntakou-Zamplara KZ, **Liakos A**, Fousteri M. (2017) “Global unleashing of transcription elongation waves in response to genotoxic stress restricts somatic mutation rate.” *Nature Communications*, 8:2076. DOI: 10.1038/s41467-017-02145-4

Liakos A, Lavigne MD, Fousteri M. (2017) *Personalized medicine*, Book chapter on “Nucleotide Excision Repair: Lessons from Neurodegeneration to Cancer”. *Springer Nature, Adv. Exp. Med. Biology*; 1007:17-39, DOI:10.1007/978-3-319-607337_2

Kyratzi E, **Liakos A**, Papadogiannaki G, Efthimiopoulos S. (2015) “Structural and regulatory elements of the interaction between amyloid-β protein precursor and Homer3.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 2015; 45(1):147-57.

ΣΥΝΕΛΠΙΑ

09 - 12 Σεπτεμβρίου 2019

Anastasios Liakos, Dimitris Konstantopoulos, Matthieu D. Lavigne, Maria Fousteri. “Fast and continuous widespread transcription initiation guarantees the integrity of all active coding and non-coding regulatory regions in response to DNA damage-induced stress”

ICSA 2019, Athens, Greece

20 - 22 Μαρτίου 2019

Anastasios Liakos, Dimitris Konstantopoulos, Zoe Spyropoulou, Maria Fousteri, Matthieu D. Lavigne.
“Elucidating the role of active transcription in keeping enome integrity in check”
International Symposium on XP and other Nucleotide Excision Repair Disorders, Cambridge, United Kingdom

25 - 27 Νοεμβρίου 2016

Anastasios Liakos, Dimitris Konstantopoulos, Matthieu D. Lavigne, Maria Fousteri. “Elucidating chromatin reorganization in response to genotoxic stress”
67th HSBMB Conference, Ioannina, Greece

27 - 30 Αυγούστου 2016

Matthieu D. Lavigne, Katerina Z. Ntakou, Dimitris Konstantopoulos, **Anastasios Liakos**, Maria Fousteri.
“A global synchronous switch to transcription elongation “Safe Mode” facilitates genome maintenance”
12th EMBL Conference “Transcription and Chromatin”, Heidelberg, Germany

28 Αυγούστου – 1 Σεπτεμβρίου 2011

Kyratzi Elli, **Liakos Anastasios**, Karousi Agapi, Papadogiannaki Georgia, Efthimiopoulos Spiros.
“Calcium regulates the intreraction between Amyloid Precursor Protein and Homer3”
ISN/ESN conference, Athens, Greece

ΓΛΩΣΣΕΣ

Ελληνικά: Μητρική γλώσσα

Αγγλικά: First Certificate in English, University of Cambridge / IELTS overall band score 7,5

Γαλλικά: Βασική γνώση

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ / ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Ομαδικά αθλήματα, κινηματογράφος, μουσική, διάβασμα, ταξίδια



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14566-9>

OPEN

Continuous transcription initiation guarantees robust repair of all transcribed genes and regulatory regions

Anastasios Liakos^{1,2,4}, Dimitris Konstantopoulos^{1,3,4}, Matthieu D. Lavigne¹ & Maria Fousteri¹

Inhibition of transcription caused by DNA damage-impaired RNA polymerase II (Pol II) elongation conceals a local increase in de novo transcription, slowly progressing from Transcription Start Sites (TSSs) to gene ends. Although associated with accelerated repair of Pol II-encountered lesions and limited mutagenesis, it is still unclear how this mechanism is maintained during genotoxic stress-recovery. Here we uncover a widespread gain in chromatin accessibility and preservation of the active H3K27ac mark after UV-irradiation. The concomitant increase in Pol II escape from promoter-proximal pause (PPP) sites of most active genes, PROMPTs and enhancer RNAs favors unrestrained initiation, as evidenced by the synthesis of nascent RNAs including start RNAs. Accordingly, drug-inhibition of PPP-release replenishes levels of pre-initiating Pol II at TSSs after UV. Our data show that such continuous engagement of Pol II molecules ensures maximal transcription-driven repair throughout expressed genes and regulatory loci. Importantly, revealing this unanticipated regulatory layer of UV-response provides physiological relevant traction to the emerging concept that Pol II initiation rate is determined by pause-release dynamics.

¹Institute for Fundamental Biomedical Research, BSRC 'Alexander Fleming', 34 Fleming st, 16672 Vari, Athens, Greece. ²Department of Biology, School of Science, National & Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ³Department of Biology, University of Crete, 70013 Heraklion, Greece. ⁴These authors contributed equally: Anastasios Liakos, Dimitris Konstantopoulos. ✉email: lavigne@fleming.gr; fousteri@fleming.gr

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-02145-4

OPEN

Global unleashing of transcription elongation waves in response to genotoxic stress restricts somatic mutation rate

Matthieu D. Lavigne¹, Dimitris Konstantopoulos¹, Katerina Z. Ntakou-Zamplara¹, Anastasios Liakos¹ & Maria Fousteri¹

Complex molecular responses preserve gene expression accuracy and genome integrity in the face of environmental perturbations. Here we report that, in response to UV irradiation, RNA polymerase II (RNAPII) molecules are dynamically and synchronously released from promoter-proximal regions into elongation to promote uniform and accelerated surveillance of the whole transcribed genome. The maximised influx of de novo released RNAPII correlates with increased damage-sensing, as confirmed by RNAPII progressive accumulation at dipyrimidine sites and by the average slow-down of elongation rates in gene bodies. In turn, this transcription elongation 'safe' mode guarantees efficient DNA repair regardless of damage location, gene size and transcription level. Accordingly, we detect low and homogenous rates of mutational signatures associated with UV exposure or cigarette smoke across all active genes. Our study reveals a novel advantage for transcription regulation at the promoter-proximal level and provides unanticipated insights into how active transcription shapes the mutagenic landscape of cancer genomes.

¹Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', 34 Fleming Street, Vari, 16672 Athens, Greece. Dimitris Konstantopoulos and Katerina Z. Ntakou-Zamplara contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.F. (email: fousteri@fleming.gr)

Nucleotide Excision Repair: From Neurodegeneration to Cancer

2

Anastasios Liakos, Matthieu D. Lavigne,
and Maria Fousteri

Abstract

DNA damage poses a constant threat to genome integrity taking a variety of shapes and arising by normal cellular metabolism or environmental insults. Human syndromes, characterized by increased cancer pre-disposition or early onset of age-related pathology and developmental abnormalities, often result from defective DNA damage responses and compromised genome integrity. Over the last decades intensive research worldwide has made important contributions to our understanding of the molecular mechanisms underlying genomic instability and has substantiated the importance of DNA repair in cancer prevention in the general population. In this chapter, we discuss Nucleotide Excision Repair pathway, the causative role of its components in disease-related pathology and recent technological achievements that decipher mutational landscapes and may facilitate pathological classification and personalized therapy.

Keywords

NER deficiency syndromes • Genotype-phenotype relationship • DNA damage responses • Cancer genomics • NER-associated somatic mutation landscapes • Synthetic lethality

2.1 Introduction

Genome integrity is a vital component of all life forms. However, it is constantly challenged by a multitude of genotoxic agents, which produce

diverse DNA lesions that alter DNA chemistry, structure and integrity. Such genotoxic agents can be found in the environment and consist of ultraviolet (UV) radiation, ionizing radiation (IR), and many pharmaceuticals, notably anticancer drugs (e.g.: cisplatin, Topoisomerase I and II inhibitors). In addition, threats can rise from endogenous metabolic products or by-products such as reactive oxygen species (ROS), alkylating agents and errors during replication (see [1–3] for review).

A. Liakos • M.D. Lavigne (✉) • M. Fousteri (✉)
Biomedical Sciences Research Center
'Alexander Fleming', 34 Fleming st.,
16672 Vari, Athens, Greece
e-mail: lavigne@fleming.gr; fousteri@fleming.gr

© American Association of Pharmaceutical Scientists 2017
S. El-Khamisy (ed.), *Personalised Medicine*, Advances in Experimental Medicine and Biology 1007,
DOI 10.1007/978-3-319-60733-7_2

17