



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Βιολογικός ρόλος και αποσαφήνιση μηχανισμών βιογένεσης και
επιδιόρθωσης τελομερικής και χρωμοσωμικής ευθραυστότητας στον
ποντικό και στον άνθρωπο.»

Κυριακάκη Μαρία
Βιολόγος

AM:41909

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης MSc, PhD, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας,
ΕΚΠΑ (Επιβλέπων Καθηγητής)

Σαράντης Γκάγκος MSc, PhD, Ερευνητής Β', Εργαστήριο Χρωμοσωμικής Αστάθειας
και Τελομερικής Δυσλειτουργίας στον Καρκίνο, ΙΙΒΕΑΑ (Επιστημονικός Υπεύθυνος)

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη PhD, Καθηγήτρια Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ερευνητική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξήχθη στο εργαστήριο Χρωμοσωμικής Αστάθειας και Τελομερικής Δυσλειτουργίας στον Καρκίνο, Τομέας Γενετικής, στο Κέντρο Βασικής Έρευνας II, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), υπό την επίβλεψη του Δρ. Σαράντη Γκάγκου, Ερευνητή Β'. Έχοντας ολοκληρώσει τη διπλωματική μου εργασία, αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε ορισμένους ανθρώπους με τους οποίους συνεργάστηκα και έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην πραγμάτωσή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή Δρ. Δημήτριο Στραβοπόδη, του τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, επιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τόσο για τις εκπαιδευτικές γνώσεις και τη βοήθεια που μου παρείχε, όσο και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, Δρ. Ισιδώρα Παπασιδέρη για την συμμετοχή της στην επιτροπή επίβλεψης της παρούσας διπλωματικής, αλλά και για τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο πρόγραμμα αυτό.

Στη συνέχεια θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Σαράντη Γκάγκο για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς επίσης και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Παράλληλα, κρίνεται επιτακτική ανάγκη να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, Ελένη Δραγώνα, Χαρά Παπαλουκά, Κατερίνα Μαρωνίτη, Μαριάννα Δελή για τη συνεχή τους βοήθεια στις πειραματικές διεργασίες, την ψυχολογική τους υποστήριξη και την καθόλα άψογη συνεργασία μας.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract.....	6
A. Εισαγωγή.....	7
1. Κοινές εύθραυστες θέσεις (<i>Common fragile sites, CFS</i>)	7
2. Εισαγωγή στη δομή και στη λειτουργία των τελομερών	8
2.1 Τελομερική θηλειά (<i>t-loop</i>)	10
2.2 Τα πρωτεϊνικά συστατικά των τελομερών	11
2.3 Ο βιολογικός ρόλος των τελομερών.....	12
3. Μηχανισμοί επιμήκυνσης των τελομερών.....	13
3.1 Τελομεράση.....	13
3.2 Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (<i>Alternative Lengthening of Telomeres pathway, ALT</i>).....	14
4. Αντιγραφή επαγόμενη από θραύση δίκλωνου DNA (<i>Break-induced Replication, BIR</i>).....	16
5. <i>EXD2 (Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2)</i>	18
6. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων DNA και τελομερική ακεραιότητα.....	18
6.1 Ομόλογος ανασυνδυασμός (<i>Homologous Recombination, HR</i>).....	20
6.2 Μηχανισμός σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (<i>Classical Non Homologous End Joining, Classical NHEJ</i>).....	20
6.3 Σύμπλοκο <i>Shieldin</i>	21
7. Τελομερική αστάθεια και χρωμοσωμική δυσλειτουργία στον καρκίνο	21
8. Σκοπός.....	22
B. Υλικά και μέθοδοι	24
1. Διατήρηση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	24
1.1 Καλλιέργεια κυττάρων	25
1.2 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη κυττάρων.....	25
2. Σύλλογή μεταφασικών χρωμοσωμάτων	26
3. Κατασκευή Καρυοτύπου για τη μελέτη δομικών και αριθμητικών μεταλλαγών.....	26
4. Φθορίζοντας <i>in-situ</i> υβριδισμός- <i>FISH</i> στα τελομερή (<i>PNA-FISH</i>).....	27
5. Προσδιορισμός του χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού με φθορίζοντα <i>in-situ</i> υβριδισμό (<i>CO-FISH</i>).....	28
6. Μικροσκοπική παρατήρηση	29
7. Στατιστική ανάλυση.....	29
8. Ανοσοστίπωση κατά <i>WESTERN</i>	29
8.1 Απομόνωση και αποδιάταξη πρωτεϊνών από ίζημα κυττάρων	30
8.2 Ηλεκτροφόρηση και Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών.....	30
Γ. Αποτελέσματα	34
1. Διερεύνηση του ρόλου του συμπλόκου της <i>Shieldin</i> στη χρωμοσωμική αστάθεια	34
1.1 Επίδραση γονοτοξικών παραγόντων σε κύτταρα που δεν εκφράζουν κάποια από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου <i>Shieldin</i>	36
2. Το ανεξάρτητο από <i>RAD52</i> μονοπάτι του <i>ALT</i> μηχανισμού αντιστοιχεί σε εσωχρωμοσωμικό συντηρητικό τρόπο αντιγραφής των τελομερών.....	37
2.1 Απώλεια της έκφρασης της <i>EXD2</i> αυξάνει τα επίπεδα εξαρτώμενης από <i>BIR</i> εσωχρωμοσωμικής συντηρητικής αντιγραφής στα τελομερή.....	37

2.2 Απώλεια της έκφρασης της RAD52 αυξάνει τα επίπεδα εξαρτώμενης από BIR εσωχρωμοσωμικής συντηρητικής αντιγραφής στα τελομερή.....	41
3. Τα επίπεδα των εύθραυστων τελομερών αυξάνονται σε βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού που δεν εκφράζουν δεσμίνη.....	43
Δ. Συζήτηση	46
Ε. Βιβλιογραφία.....	48

Περίληψη

Τα τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων και οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι περιοχές περισσότερο ευάλωτες σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και έχουν συνδεθεί τόσο με την εμφάνιση της νεοπλασίας, όσο και την ανάπτυξη γονιδιωματικής αστάθειας στον καρκίνο. Για να διατηρηθεί η γονιδιωματική ακεραιότητα τα κύτταρα ενεργοποιούν διάφορους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Για την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραυσμάτων (DSBs) και την προαγωγή της μη ομόλογης ένωσης άκρων (NHEJ) έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν δύο μη καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες, οι οποίες συγκροτούν το σύμπλοκο Shieldin, η SHLD1 και η SHLD2. Στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι η απώλεια έκφρασης αυτών των δύο πρωτεϊνών μπορεί να αυξάνει τη χρωμοσωμική αστάθεια και να κάνει τα κύτταρα πιο ευαίσθητα σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, όμως απαραίτητη είναι η διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων. Ακόμα, ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης, ο μηχανισμός ανασυνδυαστικής επιδιόρθωσης μονόπλευρων θραύσεων (BIR) αποτελεί ένα παράδειγμα ομόλογου ανασυνδυασμού και φαίνεται να παίζει καίριο ρόλο στην επιδιόρθωση των σταματημένων και σπασμένων διχάλων αντιγραφής, καθώς και στη διατήρηση του μήκους των τελομερών σε κύτταρα που δεν διαθέτουν τελομεράση. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί δύο διακριτοί μηχανισμοί BIR οι οποίοι βασίζονται στη δράση της ελικάσης BLM και εξαρτώνται ή όχι από τη ρεκομπινάση RAD52. Με την χρήση μίας νέας τεχνολογίας αποδείχθηκε ότι η απώλεια της εξωνουκλεάσης EXD2, αλλά και της ρεκομπινάσης RAD52 προκαλεί αύξηση των γεγονότων ενδοχρωμοσωμικής συντηρητικής DNA σύνθεσης. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με επιπρόσθετα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η EXD2 λειτουργεί ως ένας μοριακός διακόπτης μεταξύ των δύο μονοπατιών BIR, με την απώλειά της να ωθεί τα κύτταρα προς τον ανεξάρτητο από την RAD52 BIR μηχανισμό, ο οποίος φαίνεται να λειτουργεί κυρίως ενδοχρωμοσωμικά. Τέλος, μελετήθηκε ένας φαινότυπος ο οποίος φαίνεται να σχετίζεται με τον BIR, τα εύθραυστα τελομερή. Αποδείχθηκε ότι το ποσοστό των εύθραυστων τελομερών αυξήθηκε σε βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού που δεν εκφράζουν δεσμίνη.

Λέξεις κλειδιά: τελομερή, ALT μηχανισμός, εξωνουκλεάση EXD2, σύμπλοκο Shieldin

Abstract

Telomeres in the end of chromosomes and common fragile chromosomal sites are areas more vulnerable to chromosomal rearrangements and have been associated with both the appearance of cancer and the development of genomic instability in cancer. To maintain genomic integrity, cells activate various repair mechanisms. For the repair of double-strand breaks in DNA (DSBs) and the promotion of non-homologous end joining (NHEJ), two poorly characterized proteins have been shown to be involved in, SHLD1 and SHLD2, which form the Shieldin complex. Here it has been shown that the loss of the expression of these two proteins can increase chromosomal instability and make cells more sensitive to cytotoxic agents, but additional experiments are necessary. Another repair mechanism, the break induced replication (BIR), is an example of homologous recombination and appears to play a key role in repairing stopped and broken replication forks as well as maintaining telomere length to cells lacking telomerase. To date, two distinct BIR mechanisms have been found which are based on the action of BLM helix and depend on RAD52 recombinase or not. Using a new technology, it has been shown that the loss of EXD2 exonuclease, as well as RAD52 recombinase, causes an increase in the events of endochromosomal conservative DNA synthesis. These findings, combined with additional data, support the hypothesis that EXD2 acts as a molecular switch between the two BIR pathways, with its loss pushing cells toward the RAD52-independent BIR mechanism, which appears to function primarily endochromosomally. Finally, a phenotype that appears to be related to BIR was studied, the fragile telomeres. The percentage of fragile telomeres was shown to increase in cardiac mouse stem cells lacking desmin.

Keywords: telomeres, ALT pathway, EXD2, Shieldin complex

A. Εισαγωγή

1. Κοινές εύθραυστες θέσεις (Common fragile sites, CFS)

Οι κοινές εύθραυστες θέσεις (Common fragile sites, CFS) είναι φυσιολογικές χρωμοσωμικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από θραύσεις στα μεταφασικά χρωμοσώματα μετά από τη μερική αναστολή της σύνθεσης του DNA λόγω στρες αντιγραφής (Glover and Stein, 1987). Οι θέσεις αυτές είναι συχνά σημεία που επάγουν τη χρωμοσωμική αστάθεια σε καρκίνους και συχνά σχετίζονται με διαγραφές ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ενίσχυση ογκογονιδίων (Bignell et al, 2010; Hellman et al, 2002; Miller et al, 2006). Επίσης σχετίζονται με την αλλαγή των αντιγράφων του γονιδιώματος (Copy number variation, CNV) στα καρκινικά κύτταρα, είναι επιρρεπείς σε ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων, αλλά και αποτελούν συχνούς στόχους ενσωμάτωσης εξωγενούς DNA (Durkin & Glover, 2007). Δεδομένου ότι η αστάθεια που εμφανίζεται στις θέσεις αυτές, εμφανίζεται σε προ-καρκινικά στάδια, πριν την εμφάνιση αστάθειας σε άλλους γονιδιωματικούς τόπους (Bester et al, 2011), οι CFSs θεωρείται ότι είναι μια κινητήρια δύναμη για την ογκογένεση.

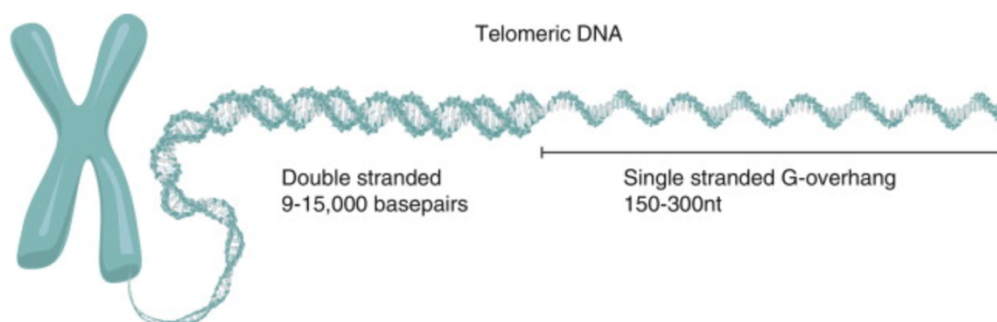
Μετά από χρόνιες μελέτες έχουν καταγραφεί αρκετά χαρακτηριστικά των CFSs που συμβάλλουν στην ευθραυστότητά τους. Ένα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι ότι οι CFSs περιέχουν δύσκολα αντιγραφόμενες αλληλουχίες DNA, όπως αλληλουχίες πλούσιες σε AT, οι οποίες τείνουν να σχηματίζουν δευτερογενείς δομές DNA, που δυσκολεύουν τη συνέχεια της αντιγραφής. Οι CFSs αντιγράφονται αργά, όμως υπό κανονικές συνθήκες παραμένουν σταθερές και εξακολουθούν να διατηρούνται. Ωστόσο σε συνθήκες στρες αντιγραφής, η αντιγραφή στις θέσεις αυτές διαταράσσεται και καθυστερεί περαιτέρω, με αποτέλεσμα την ατελή αντιγραφή αυτών όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη μίτωση. Η εμφάνιση θραύσεων και κενών σε κοινές εύθραυστες θέσεις ενισχύεται όταν το στρες αντιγραφής συνδυάζεται με ανεπαρκή λειτουργία του μονοπατιού της ATR, το οποίο ανταποκρίνεται σε σταματημένους βρόγχους αντιγραφής (Casper et al., 2002). Παράλληλα, η αδυναμία επισκευής με σκοπό την επανεκκίνηση της αντιγραφής, έχει ως αποτέλεσμα την κατάρρευση του βρόγχου αντιγραφής και επομένως την επιδείνωση της έκφρασης CFSs. Η παραδοχή ότι οι κοινές εύθραυστες θέσεις αντιπροσωπεύουν περιοχές στις οποίες οι διχάλες αντιγραφής σταματούν και καταρρέουν είναι σύμφωνη με τον αυξημένο ρυθμό ανασυνδυασμού σε αυτούς του γενετικούς τόπους (Feichtinger & Schmid, 1989; Glover & Stein, 1987). Πράγματι οι CFSs είναι σημεία επιρρεπή σε διαγραφές και άλλες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στον καρκίνο (Yunis & Soreng, 1984; LeBeau & Rowley, 1984).

Τα τελομερή, ειδικές νουκλεοπρωτεϊνικές δομές στα άκρα των χρωμοσωμάτων μπορούν να θεωρηθούν ως κοινές εύθραυστες θέσεις λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Τα άκρα των χρωμοσωμάτων στα θηλαστικά αποτελούνται από μακριές συστοιχίες επαναλήψεων TTAGGG, δεσμευμένες με ένα ειδικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο (σύμπλοκο της Σελτερίνης) που προστατεύει τα άκρα των χρωμοσωμάτων και καταστέλλει την απόκριση βλάβης του DNA και τη σηματοδότηση επιδιορθωτικών μηχανισμών στις περιοχές αυτές. Τα δεδομένα δείχνουν ότι οι τελομερικές επαναλήψεις σε ποντίκια και ανθρώπους αποτελούν πρόκληση για τον μηχανισμό αντιγραφής του DNA, δημιουργώντας ελαττώματα εξαρτώμενα από την αντιγραφή που μοιάζουν με αυτά των κοινών εύθραυστων θέσεων (Sfeir et al, 2009).

Τα τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων και οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι περιοχές περισσότερο ευάλωτες σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και έχουν συνδεθεί τόσο με την εμφάνιση της νεοπλασίας όσο και την ανάπτυξη γονιδιωματικής αστάθειας στον καρκίνο. Σε αντιστοιχία με τις κοινές εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος, τα τελομερή καρκινικών κυττάρων και κυττάρων που υφίστανται στρες αντιγραφής, παρουσιάζουν έναν ιδιαίτερο φαινότυπο, ο οποίος ανιχνεύεται σε μεταφασικά χρωμοσώματα ως πολλαπλά ή εκτεταμένα σήματα τελομερικού φθορισμού *in situ* υβριδισμού (FISH) σε μεμονωμένα χρωματιδικά άκρα και ονομάζεται «εύθραυστα τελομερή» (Fragile Telomeres, FTs) (Martinez et al, 2009; Sfeir, 2009). Τα εύθραυστα τελομερή φαίνεται να προκύπτουν κατά τη φάση S με ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση μονόπλευρων δίκλωνων θραύσεων του DNA, μέσω της ενεργοποίησης ενός παράπλευρου μηχανισμού επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων του DNA- Break induced replication (BIR).

2. Εισαγωγή στη δομή και στη λειτουργία των τελομερών

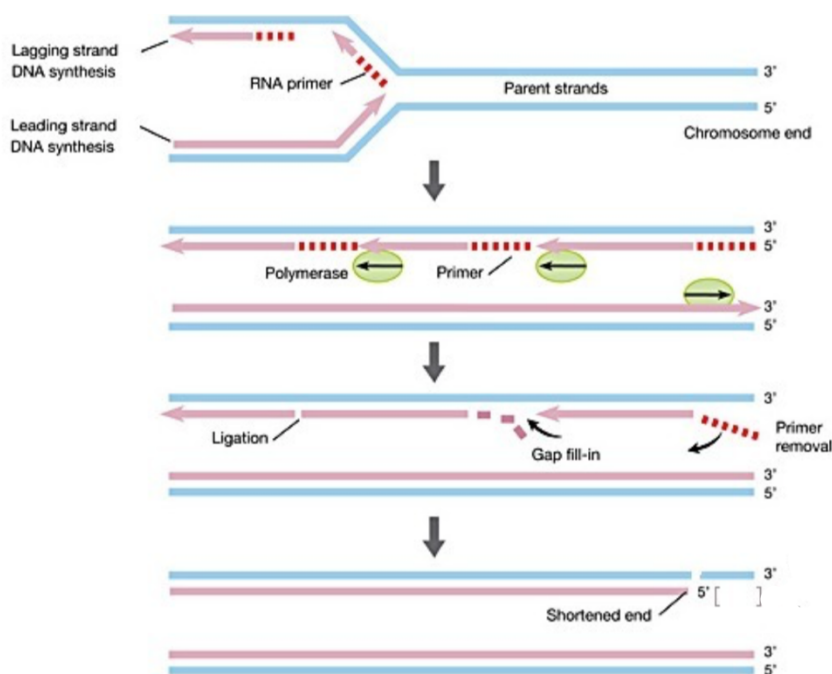
Τα τελομερή είναι νουκλεοπρωτεϊνικές δομές στα άκρα των ευκαρυωτικών γραμμικών χρωμοσωμάτων (Bolzan & Bianchi, 2006) και θεωρούνται υπεύθυνα για τη σταθεροποίηση και διατήρηση της ακεραιότητας των χρωμοσωμάτων. Ο όρος τελομερή ή τελομερίδια (telomeres) προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «τέλος» και «μέρος» και εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία από τους Muller et al 1940 και McClintock et al 1941, για να περιγράψουν τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία αυτών και τη σταθερότητα του γονιδιώματος κάθε οργανισμού. Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη (5-TTAGGG-3')_n, ειδικά RNA και από ένα προστατευτικό σύμπλοκο πρωτεϊνών, γνωστό και ως «Σύμπλοκο Σελτερίνης» (de Lange, 2005; Viscardi et al, 2005; Bolzan & Bianchi, 2006). Οι νουκλεοτιδικές επαναλήψεις απαρτίζονται από δίκλωνες αλληλουχίες DNA οι οποίες καταλήγουν σε μονόκλιωνα 3' ελεύθερα άκρα, πλούσια σε μόρια γουανίνης (G-rich overhang) (Blasco, 2005; Bolzan & Bianchi, 2006), μήκους περίπου 50-300 νουκλεοτιδίων (O'Sullivan & Karlseder, 2010). Τα τελομερή των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων στα σωματικά κύτταρα έχουν μήκος κατά μέσο όρο 10 kb. Κατά τη γέννηση του ανθρώπου τα τελομερή είναι περίπου 20 kb και σταδιακά μειώνονται με κάθε κυτταρική διαίρεση έως περίπου τα 3 kb (Cooke & Smith, 1986; de Lange, 1990; Harley et al, 1990).



Εικόνα 1: Δομή ανθρώπινων τελομερών. Το τελομερικό DNA αποτελείται από επαναλήψεις TTAGGG, σχηματίζοντας μια μακριά περιοχή δίκλωνου DNA που καταλήγει στη μονόκλιωνα προεξοχή πλούσια σε G (Sandin and Rhodes, 2014).

Έπειτα από κάθε κυτταρική διαίρεση, σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα, λόγω της μη συνεχούς σύνθεσης του ενός κλώνου του DNA, της οξειδωτικής βλάβης και άλλων παραγόντων συμβαίνει μια προοδευτική μείωση των τελομερών, της τάξης περίπου των 50 με 100 ζευγών νουκλεοτιδίων. Αυτή η μείωση οδηγεί τελικά σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και πιστεύεται ότι είναι ένα αρχικό εμπόδιο στον σχηματισμό όγκων σε ανθρώπους και σε άλλα μακρόβια ζώα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως στο πρόβλημα της αντιγραφής των γραμμικών άκρων DNA, καθώς κατά την αντιγραφή της μη συνεχούς νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, μέσω τμημάτων Okazaki, το 3' άκρο της πατρικής αλυσίδας παραμένει μονόκλωνο (Olovnikov, 1973; Watson, 1972).

Ο μηχανισμός της αντιγραφής του DNA βασίζεται στην ικανότητα κάθε κλώνου ενός μορίου DNA (πατρικού κλώνου) να λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου (θυγατρικού κλώνου), με αποτέλεσμα η καθεμία από τις νεοσυντιθέμενες διπλές έλικες του DNA να αποτελείται από έναν παλιό κι έναν εντελώς νέο κλώνο (ημισυντηρητική αντιγραφή του DNA). Όλες οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν DNA με κατεύθυνση 5' προς 3', ενώ δεν μπορούν να ξεκινήσουν την αντιγραφή de novo. Για το λόγο αυτό, απαιτείται η ύπαρξη ενός RNA εκκινητή, μεγέθους 8-12 νουκλεοτιδίων. Κατά την αντιγραφή του συνεχούς νεοσυντιθέμενου κλώνου (leading strand), οι DNA πολυμεράσες επιμηκύνουν τους RNA εκκινητές κατά συνεχόμενο τρόπο, έως ότου φτάσουν στο τέλος του χρωμοσώματος δημιουργώντας ισοζυγισμένα άκρα (blunt ends) (Wellinger & Zakian, 2012). Αντίθετα κατά την αντιγραφή του ασυνεχούς νεοσυντιθέμενου κλώνου (lagging strand) κάθε τμήμα Okazaki ξεκινά με έναν RNA εκκινητή, με αποτέλεσμα το τελευταίο RNA τμήμα να απομακρύνεται χωρίς να μπορεί να αντικατασταθεί από τις DNA πολυμεράσες (Greider, 2016). Έτσι δημιουργείται μία προεξοχή του 3' άκρου.



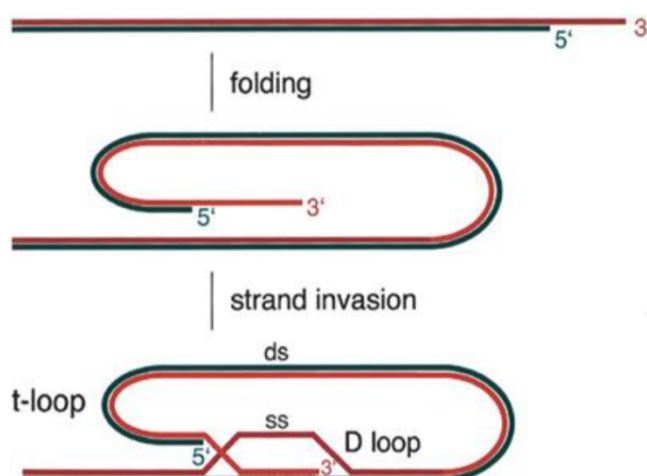
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA και του προβλήματος που προκύπτει από αυτή. Μετά το τέλος κάθε κύκλου αντιγραφής προκύπτει ένα μονόκλωνο 3' άκρο σε κάθε χρωμόσωμα.

Μέσω της προοδευτικής μείωσης, το μήκος των τελομερών φτάνει σ' ένα κρίσιμο μέγεθος, στο οποίο ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA που οδηγούν το κύτταρο σε γήρανση και απόπτωση, με σκοπό την αποφυγή χρωμοσωμικών αναδιατάξεων και συντήξεων (Ennour-Idrissietal, 2017). Το κρίσιμο αυτό μέγεθος ονομάζεται όριο Hayflick (Hayflick limit) και αποτελεί ένα πεπερασμένο αριθμό αντιγράφων που επιτρέπονται από το κύτταρο (Hayflick, 1965).

Η απώλεια όμως του τελομερικού μήκους, εκτός από το πρόβλημα της αντιγραφής κατά τις αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις, μπορεί να οφείλεται και στην οξειδωτική βλάβη στο τελομερικό DNA (Kawanishi & Oikawa, 2004; von Zglinicki et al, 1995), στη δράση εξωνουκλεασών στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Makarov et al, 1997) ή στην απώλεια μηχανισμών νεοσύνθεσης του τελομερούς (Blasco et al, 1997).

2.1 Τελομερική θηλειά (t-loop)

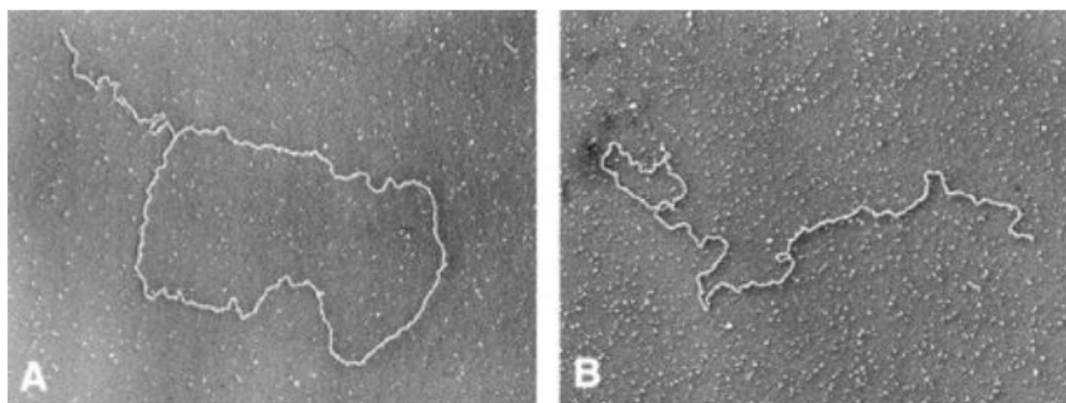
Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι τα τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου παρουσιάζουν ιδιόμορφη τεταρτοταγή δομή, η οποία συμβάλλει στην προστασία τους. Η διαμόρφωση αυτή των τελομερών από τη μία προστατεύει τα άκρα των χρωμοσωμάτων από τη δράση εξωνουκλεασών και τελομερικών συντήξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων, ενώ επίσης επιτυγχάνεται η μη αναγνώριση των τελομερών ως θραύσματα της διπλής έλικας (DSB, Double Strand Breaks) (de Lange, 2009). Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η επιστράτευση επιδιορθωτικών μηχανισμών, η δράση των οποίων θα είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή του κυτταρικού κύκλου (Longhese, 2008). Πιο συγκεκριμένα, το γραμμικό τελομερές αναδιπλούμενο καταλήγει σε έναν μεγάλο βρόγχο, τον T-βρόγχο (t-loop), ο οποίος φέρει στο 3' άκρο του μια μονόκλωνη προέκταση, μήκους μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων (bp), η οποία είναι πλούσια σε βάσεις γουανίνης (G) (3' G-strand overhang) (Wright et al, 1997; Elwood, 2004). Η 3' προέκταση με τη σειρά της παρεμβάλλεται στο δίκλωνο τελομεριδιακό DNA με τρόπο που προκύπτει ένας δεύτερος μικρότερος βρόγχος, ο D-βρόγχος (D-loop), ο οποίος φαίνεται να συμβάλλει στη σταθεροποίηση του μεγάλου T-βρόγχου (Greider, 1996; Griffith et al, 1999).



Εικόνα 3: Δομή της T-θηλειάς. Η 3' μονόκλωνη ουρά εισβάλλει στο παρακείμενο δίκλωνο τελομερικό DNA, σχηματίζοντας έτσι μια D-θηλειά (de Lange, 2005).

Ο T-βρόγχος εμπλουτίζεται με μία σειρά πρωτεϊνών που δένονται στο μονόκλωνο άκρο του τελομερικού DNA. Αρκετές πρωτεΐνες που προσδένονται στο τελομερές είναι

υπεύθυνες για την αυτοσυγκρότηση του τελομερούς, καθώς και τη ρύθμιση του μήκους του (de Lange, 2004).



Εικόνα 4: Απεικόνιση T-θηλειάς από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Griffith et al, 1999)

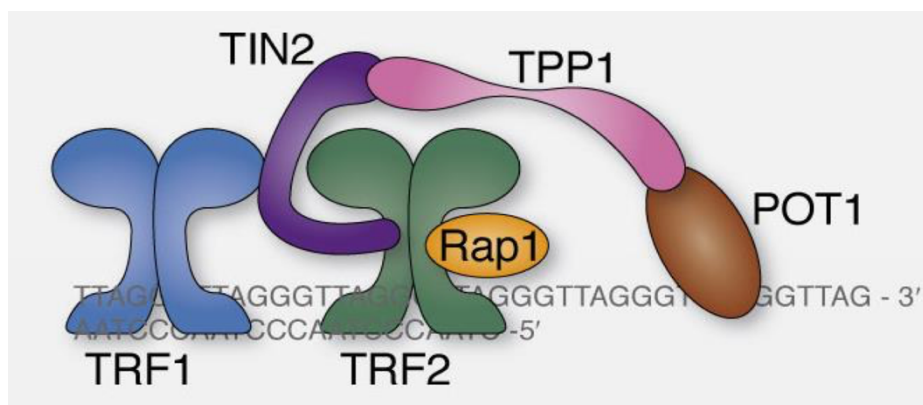
2.2 Τα πρωτεϊνικά συστατικά των τελομερών

Το τελομερικό DNA στα θηλαστικά συσχετίζεται με μία σειρά πρωτεϊνών οι οποίες είναι απαραίτητες για την εύρυθμη λειτουργία τους, αλλά και την προστασία αυτών. Οι κύριοι αυτοί πρωτεϊνικοί παράγοντες είναι τα νουκλεασώματα, οι έξι ειδικές πρωτεΐνες που αποτελούν το σύμπλοκο της Σελτερίνης και ένα σύνολο άλλων πρωτεϊνών, η παρουσία όμως των οποίων δεν είναι ειδική για τα τελομερή (de Lange, 2005).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότερες TTAGGG επαναλήψεις είναι πακεταρισμένες σε νουκλεοσωμική χρωματίνη (Makarov et al, 1993). Πιο συγκεκριμένα το μεγαλύτερο μέρος των επαναλήψεων του τελομερούς στον άνθρωπο διαθέτει νουκλεασώματα, τα οποία προέρχονται από τη περιέλιξη 147 bp DNA στο οκταμερές των ιστονών (Soman et al, 2020). Το τελομερικό DNA δημιουργεί μια χρωματινική δομή που χαρακτηρίζεται από πολλαπλά διαταγμένα νουκλεασώματα, σφιχτά πακεταρισμένα που διαχωρίζονται από συνδετικό DNA (linker DNA) κατά 40 bp βραχύτερα από το υπόλοιπο γονιδίωμα (Makarov et al, 1993; Nikitina & Woodcock, 2004). Η χρωματίνη των τελομερών διαθέτει τη χαρακτηριστική ιστόνη H1, η οποία φαίνεται να υπάρχει σε αναλογία 1:1 H1/οκταμερές ιστονών (Galati et al, 2013). Ακόμα, ανάλυση της χρωματινικής T-θηλειάς με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι νουκλεασώματα προσδένονται σε όλο το μήκος της τελομερικής ουράς αλλά και του τελομερικού βρόγχου (Nikitina & Woodcock, 2004).

Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι τα τελομερή συνδέονται με ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, το οποίο προστατεύει, έμμεσα, τα μονόκλινα άκρα του χρωμοσώματος να μην γίνουν αντιληπτά από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, ως σημεία θραύσης. Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται Σελτερίνη (Shelterin complex) και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 και RAP1 (de Lange, 2005). Οι τρεις (TRF1, TRF2 και POT1) από αυτές τις πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα με τις τελομερικές επαναλήψεις TTAGGG, ενώ οι άλλες τρεις (TIN2, TPP1 και Rap1) αλληλεπιδρούν έμμεσα με το τελομερικό DNA, καθώς αλληλοσυνδέονται με τις πρώτες (Chong et al, 1995; Baumann & Cech, 2001; de Lange, 2005). Πιο συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες TRF1 και TRF2 προσδένονται στη δίκλινη αλυσίδα των τελομερών και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες TIN2 και Rap1. Η TIN2 βοηθάει στην

πρόσδεση του ετεροδιμερούς, που αποτελείται από την TPP1 και την POT1, στις TTAGGG επαναλήψεις της μονόκλωνης αλυσίδας (de Lange, 2005; Sfeir & de Lange, 2012). Το σύμπλοκο της Σελτερίνης έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στον σχηματισμό της T-θηλειάς στα τελομερή, αλλά και συνεργάζεται με πολλές πρωτεΐνες του μονοπατιού της ανασυνδυαστικής επιδιόρθωσης του DNA (de Lange & Petrini, 2000). Απώτερος σκοπός της κάλυψης των τελομερικών άκρων από τη Σελτερίνη και της δημιουργίας της T-θηλειάς είναι η μη αναγνώριση των μονόκλωνων άκρων των τελομερών, ως σημεία θραύσης, από μηχανισμούς επιδιόρθωσης.



Εικόνα 5: Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο της Σελτερίνης (Sfeir, 2012)

Εκτός των πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμβάλλουν στην προστασία των τελομερών και στη διατήρηση της δομής τους, σημαντικό ρόλο παίζουν μακρά μη κωδικά RNA, τα λεγόμενα TERRA (telomeric repeat-containing RNA). Αν και μέχρι τώρα, τα τελομερή θεωρούνταν μεταγραφικά αθόρυβα, αποδείχθηκε ότι τα τελομερή θηλαστικών μεταγράφονται παράγοντας μεγάλα μετάγραφα RNA. Αυτά να μετάγραφα δημιουργούν υβρίδια DNA-RNA στις περιοχές αυτές, αποτελώντας έναν ακόμα μηχανισμό προστασίας των τελομερών (Azzalin et al, 2007).

2.3 Ο βιολογικός ρόλος των τελομερών

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες των τελομερών είναι η διατήρηση της ακεραιότητας των χρωμοσωμάτων. Τα τελομερή παρεμποδίζουν την αναγνώριση των μονόκλωνων άκρων των χρωμοσωμάτων από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου ως δίκλινα θραύσματα DNA (Double Strand Breaks, DSBs), προστατεύοντάς τα από αποικοδόμηση, ανασυνδυασμό ή σύντηξη (Cervantes & Lundblad, 2002; Chan & Blackburn, 2002; de Lange, 2002; Kaufmann, 1989; McEachern et al, 2000). Επίσης ένας άλλος κύριος ρόλος είναι η προστασία των άκρων των χρωμοσωμάτων από τη συνεχή σμίκρυνση λόγω ανεπαρκούς πολυμερισμού του DNA και τη δράση αποδομητικών ενζύμων ή ελεύθερων ριζών, δρώντας ως ρυθμιστής του «προσδόκιμου ζωής» των κυττάρων, καθορίζοντας τον αριθμό των αντιγραφών που μπορεί να υποστεί το DNA (Gagos & Irminger-Finger, 2005; Bolzan & Bianchi, 2006). Μελέτες κυτταροκαλλιιεργειών φυσιολογικών κυττάρων έδειξαν ότι τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα δεν έχουν απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού in vitro, αλλά είναι προγραμματισμένα να πραγματοποιούν έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (Bodnar et al, 1998; Mathon et al, 2001). Η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων ποικίλει πολύ και σχετίζεται με την ηλικία του οργανισμού από τον οποίο προήλθαν τα κύτταρα (McEachern et al, 2000).

Ακόμα μελέτες έχουν δείξει ότι τα τελομερή, εκτός της φυσιολογικής προστασίας των χρωμοσωμικών άκρων, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και σε κυτταρικές διεργασίες, όπως στη λειτουργική οργάνωση της χρωματίνης στον πυρήνα των κυττάρων, το ορθό ζευγάρι των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση και το σωστό διαχωρισμό τους κατά τη μίτωση και τη μείωση (de Lange, 1992; Luderus et al, 1996; Weipoltshammer et al, 1999). Στα ανθρώπινα κύτταρα τα τελομερή των χρωμοσωμάτων δε διευθετούνται τυχαία στο εσωτερικό του πυρήνα των κυττάρων, αλλά παρουσιάζουν μία δυναμική οργάνωση, η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και περιλαμβάνει μη τυχαίες αλληλεπιδράσεις των τελομερών μεταξύ τους, αλλά και με ορισμένες θέσεις του πυρηνικού φακέλου των κυττάρων. Έτσι, τα τελομερή συμβάλλουν στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του πυρήνα, καθώς και της τοπολογίας των χρωμοσωμάτων στο εσωτερικό του (Molenaar et al, 2003; Chuang et al, 2004).

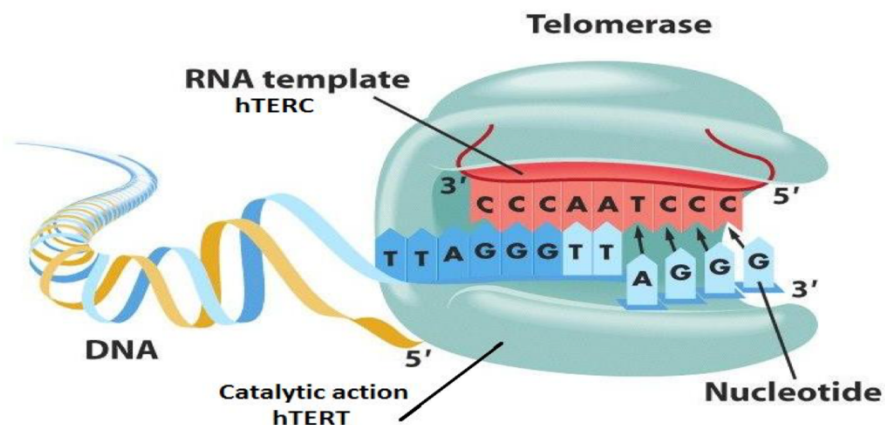
Τέλος, ιδιαίτερη ιδιότητα των τελομερών αποτελεί η ικανότητα αποσιώπησης γονιδίων που εδράζονται σε υποτελομεριαδικές περιοχές, ένα φαινόμενο που ονομάζεται επίδραση της θέσης των τελομερών (telomere position effect). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να ρυθμίζεται τόσο από το μήκος των τελομερών, όσο και από τη δομή της ετεροχρωματίνης (Baur et al, 2001; Koering et al, 2002). Τα γονίδια απενεργοποιούνται όταν μετακινηθούν πλησιέστερα σε μια περιοχή ετεροχρωματίνης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει κατά την απομάκρυνση τους από αυτήν.

3. Μηχανισμοί επιμήκυνσης των τελομερών

Τα τελομερή προστατεύουν τα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, οι περισσότεροι ανθρώπινοι φυσιολογικοί ιστοί όμως δεν διαθέτουν κάποιο μέσο για την πλήρη διατήρηση των τελομερών τους, έτσι τα ενεργά διαιρούμενα κύτταρα επιδεικνύουν προοδευτική τελομερική απώλεια μετά από κάθε γύρω αντιγραφής, με αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου (Blansco, 2005; Sabatier et al, 2005). Στα φυσιολογικά κύτταρα η γήρανση και η απόπτωση είναι φυσικά βιολογικά εμπόδια για τη δημιουργία νεοπλασίας (Halazonetis et al, 2008). Για να ξεπεράσουν αυτά τα εμπόδια, οι ανθρώπινες κακοήθειες διατηρούν το συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενεργοποιώντας την τελομεράση (Blansco, 2005) ή χρησιμοποιώντας την εναλλακτική οδό επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) (Bryan et al, 1995).

3.1 Τελομεράση

Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη που προσθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες επιμηκώνοντας τα τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου ενζύμου αποτελεί η ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, δηλαδή μπορεί να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα RNA. Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τις Greider και Blackburn το 1985, στο βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila*, αποκαλύπτοντας ότι τα τελομερή μπορούν να συντεθούν *de novo* από την τελομεράση, με την επιμήκυνση του 3' άκρου των τελομερών. Η ανθρώπινη τελομεράση αποτελείται από δύο κύριες υπομονάδες, μία RNA υπομονάδα (human Telomerase RNA Component- hTERC) (Feng et al, 1995) που λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση τελομερικού DNA και μία καταλυτική υπομονάδα (human Telomerase Reverse Transcriptase- hTERT) με δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (Lingner et al, 1997; Harrington et al, 1997).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου της τελομεράσης. Επιμήκυνση των τελομερών από την τελομεράση με τη βοήθεια της καταλυτικής υπομονάδας με δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης hTERC (Σύνδεσμος 2)

Η τελομεράση χρησιμοποιεί αποκλειστικά την 3' μονόκλωνη προεξοχή (G-rich αλυσίδα) των τελομερών ως εκκινήτη και προσθέτει διαδοχικά τα TTAGGG νουκλεοτίδια στα τελομερή επιμηκώνοντας τα κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ κατά το τέλος της S φάσης, ένα τμήμα της μετατρέπεται σε δίκλωνο με τη δράση των DNA πολυμερασών α και δ (Blackburn, 2005; Bolzan & Bianchi, 2006; Wright & Shay, 2001; Verdyn & Karlseder, 2007). Επιπλέον φέρει ικανότητα κοπής βάσεων αποτρέποντας τον υβριδισμό του ενζύμου με μη τελομερικές αλληλουχίες (Collins & Greider, 1993).

Στους ανθρώπους η τελομεράση εκφράζεται κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης και έπειτα καταστέλλεται. Απουσιάζει από την πλειονότητα των φυσιολογικών ανθρώπινων σωματικών κυττάρων με εξαίρεση την αρσενική γαμετική σειρά, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές και τα βλαστοκύτταρα (Bolzan & Bianchi, 2006; Harle-Bachor & Boukamp, 1996; Hines et al, 2005). Αντίθετα, φαίνεται ότι η τελομεράση ενεργοποιείται στο 85-90% των καρκίνων δημιουργώντας ένα θετικό ισοζύγιο στη διακύμανση του μήκους των τελομερών οδηγώντας στην αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης και απόπτωσης (Kim et al, 1994; Shay & Bacchetti, 1997).

3.2 Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (Alternative Lengthening of Telomeres pathway, ALT)

Ένα ποσοστό κακοηθειών της τάξεως του 10-15% χρησιμοποιούν μία ανεξάρτητη από τελομεράση αλλά εξαρτώμενη από τον ανασυνδυασμό διαδρομή για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών (Dilley & Greenberg, 2015; Hearphy et al, 2011; Reddel, 2014). Αυτή η οδός, η οποία αναφέρεται ως Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (Alternative Lengthening of Telomeres pathway, ALT) είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος σε καρκίνους που στερούνται τελομεράσης. Το μονοπάτι ALT περιγράφηκε αρχικά στο ζυμομήκυτα *Saccharomyces cerevisiae* καθώς και σε αθανατοποιημένα και καρκινικά κύτταρα θηλαστικών που στερούνται τελομεράσης (Bryan et al, 1995; Rizki & Lundblad, 2001). Στην ανθρώπινη νεοπλασία, η οδός ALT έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους επιθετικού καρκίνου, όπως το οστεοσάρκωμα, το λυομυοσάρκωμα, οι αστροκυτταρικοί όγκοι και οι παγκρεατικοί νευροενδοκρινικοί όγκοι (Henson & Reddel, 2010). Τέτοιου τύπου καρκίνοι αποτελούν πρόβλημα για την ιατρική πράξη, καθώς προβάλλουν αντίσταση σε θεραπείες με αναστολείς τελομεράσης

(Shay et al, 2012). Ο μηχανισμός της εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερών βασίζεται σε ένα παράπλευρο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, το οποίο ονομάζεται Αντιγραφή επαγόμενη από θραύση δίκλωνου DNA (Break induced replication, BIR). Το σύστημα αυτό της επιδιόρθωσης του DNA έχει την ικανότητα να νεοσυνθέσει πολύ μεγάλα τμήματα DNA και μάλιστα όχι με ημισυντηρητικό τρόπο αντιγραφής, αλλά με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής (Roumelioti et al, 2016).

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό για την επιμήκυνση των τελομερών τους, εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνηγορούν με την υπόθεση πως ο ALT μηχανισμός βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous recombination – HR) (Conomos et al, 2013). Στα χαρακτηριστικά αυτά συμπεριλαμβάνονται η εκτεταμένη ετερογένεια στο μήκος των τελομερών (Bryan et al, 1995; Bryan et al, 1997), το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από < 2 kb έως > 50 kb (Henson et al, 2002; Cesare & Reddel, 2008). Ακόμα ένα γνώρισμα είναι η ταχεία αύξηση και μείωση του μήκους των τελομερών (Murnane et al, 1994), καθώς και η ύπαρξη γραμμικού και κυκλικού εξωχρωμοσωμικού τελομερικού DNA (Henson et al, 2009; Cesare & Griffith, 2004). Το κυκλικό, εξωχρωμοσωμικό τελομερικό DNA μπορεί να είναι δίκλωνο: t-circles ή μερικώς δίκλωνο: C-circles και G-circles, ανάλογα με την εμπλεκόμενη τελομερική αλληλουχία (Cesare & Reddel, 2010). Ωστόσο, μόνο τα C-circles φαίνεται να αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό του ALT μηχανισμού. Τα επίπεδα των εξωχρωμοσωμικών κύκλων C (C-circles) σχετίζονται με τα επίπεδα σύνθεσης τελομερικού DNA σε ALT θετικά κύτταρα και η αφθονία τους χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης ενεργοποίησης της ALT οδού (O'Sullivan et al, 2014; Sobinoff et al, 2017; Yu et al, 2015). Παρ' όλα αυτά ο τρόπος δημιουργίας τους παραμένει άγνωστος.

Επιπλέον, στα χαρακτηριστικά του ALT μηχανισμού συμπεριλαμβάνονται η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ανασυνδυασμού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (Telomeresister chromatid exchange, T-SCE) (Londono-Vallejo et al, 2004), καθώς και η παρουσία σφαιρικών πυρηνικών δομών, πλούσιων σε πρωτεΐνη PML (Promyelocytic Leukemia, PML), ή αλλιώς ονομαζόμενα APBs (ALT-associated PML bodies, APBs) (Yeager et al, 1999). Τα σωματίδια αυτά, περιέχουν τελομερικό DNA, πρωτεΐνες του συμπλόκου της σελετερίνης και παράγοντες που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, όπως το σύμπλοκο MRN (Mre11–Rad50–Nbs1) (Henson et al, 2002). Μελέτες απεικόνισης υψηλής ανάλυσης έχουν αποδείξει την ύπαρξη συστάδων τελομερών γύρω από τα σωματίδια PML (Draskovic et al, 2009). Τα τελομερή των χρωμοσωμάτων φαίνεται να δεσμεύονται και να αποδεσμεύονται από τα APBs με δυναμικό τρόπο, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεχή επιμήκυνσή τους (Molenaar et al, 2003). Ο αριθμός των APBs αυξάνεται κατά την G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ενεργοποιημένος (Grobely et al, 2000).

Επιπλέον, καρκινικοί όγκοι που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό για την επιμήκυνση των τελομερών τους χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας, τα οποία προάγουν μια πληθώρα τυχαίων και κλωνικών δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών και πολύ συχνών αριθμητικών χρωμοσωμικών μεταλλαγών (Scheel et al, 2001; Sakellariou et al, 2013). Συνολικά, τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι ο ALT μηχανισμός, μέσω της τελομερικής δυσλειτουργίας και της αυξημένης χρωμοσωμικής αστάθειας, σε σχέση με τα κύτταρα που φέρουν ενεργή τελομεράση (Sakellariou et al, 2013), συντηρεί τη γενετική ετερογένεια μέσα σε ένα όγκο και προάγει την ταχύτερη εξέλιξή του.

3.2.1 Πιθανοί μηχανισμοί ALT

Από γενετικές μελέτες δύο μηχανισμοί ALT έχουν εντοπιστεί στο ζυμομήκυτα *Saccharomyces cerevisiae*, ο τύπου I και ο τύπου II ALT (Teng et al, 1999; Lydeard et al, 2007; Teng et al, 2000; Chen et al, 2001). Ο ALT τύπου I στη ζύμη μεσολαβείται από μία διαδικασία ανασυνδυασμού που εξαρτάται από την πρωτεΐνη Rad51, ενώ ο ALT τύπου II είναι ένας ανεξάρτητος από την Rad51. Και τα δύο αυτά μονοπάτια στη ζύμη απαιτούν την ύπαρξη της Pol32, μία υπομονάδα DNA πολυμεράσης δ κρίσιμη για της αντιγραφή επαγόμενη από θραύση δίκλωνου DNA (Break-induced Replication, BIR) (Lydeard et al, 2007). Στους ανθρώπινους καρκίνους, η οδός ALT μπορεί επίσης, να μεσολαβείται από δύο ή περισσότερους διαφορετικούς μηχανισμούς. Ο ένας μηχανισμός είναι εξαρτώμενος από τη ρεκομπινάση RAD52, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αντιγραφή του DNA που προκαλείται από θραύση (BIR), ενώ ο δεύτερος είναι ανεξάρτητος της RAD52 και είναι αυτός ο μηχανισμός που θεωρείται ότι παράγει τους εξωχρωμοσωμικούς κύκλους C (C-circles) (Zhang et al, 2019). Η εξαρτώμενη από RAD52 οδός προωθεί άμεσα τον σχηματισμό τελομερικού βρόγχου D και απαιτείται για τη διατήρηση των τελομερών σε ALT θετικά κύτταρα. Απουσία της RAD52 ο σχηματισμός C-circles και η σύνθεση DNA μέσω ALT αυξάνονται σταδιακά καθώς τα τελομερή μικραίνουν, μέσω διαδικασιών που εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες BLM, POLD3 και POLD4, υποδηλώνοντας ότι και αυτή η οδός σχετίζεται με τον BIR. Η παρουσία κύκλων c σε ALT θετικά κύτταρα που εκφράζουν την RAD52 υποδηλώνει ότι τα δύο μονοπάτια δουλεύουν ταυτόχρονα (Zhang et al, 2019).

Παρόλα αυτά, πολλά ερωτήματα σχετικά με τον μηχανισμό ALT παραμένουν αναπάντητα. Για παράδειγμα, άγνωστος παραμένει ο ρόλος της συντηρητικής αντιγραφής μεταξύ των δύο μονοπατιών του ALT, καθώς και η σχέση η οποία τα συνδέει. Επίσης, μένει να απαντηθεί αν οι δύο μηχανισμοί αφορούν ενδοχρωμοσωμικές ή διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, αν υπάρχουν μόρια κλειδιά που ενεργοποιούν τον έναν ή τον άλλο μηχανισμό και αν οι δύο μηχανισμοί μπορούν να έχουν συναγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους.

4. Αντιγραφή επαγόμενη από θραύση δίκλωνου DNA (Break-induced Replication, BIR)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης BIR αποτελεί ένα παράδειγμα ομόλογου ανασυνδυασμού, ο οποίος φαίνεται να παίζει καίριο ρόλο στην επιδιόρθωση των σταματημένων και σπασμένων διχάλων αντιγραφής, καθώς και στη διατήρηση του μήκους των τελομερών σε κύτταρα που δεν διαθέτουν τελομεράση. Σε πρότυπα μοντέλα που έχει μελετηθεί ο μηχανισμός, όπου ο ανασυνδυασμός μπορεί να ξεκινήσει από μία συγκεκριμένη δίκλωνη ρήξη, ο BIR πραγματοποιείται όταν ένα άκρο της δίκλωνης ρήξης υφίσταται εισβολή σε ένα ομόλογο χρωμόσωμα (Llorente et al, 2008). Η εισβολή της αλυσίδας θεωρείται ότι οδηγεί στο σχηματισμό μιας αντιγραφικής διχάλας μονής κατεύθυνσης, η οποία μπορεί να αντιγράψει χιλιάδες ζεύγη βάσεων μέχρι το τέλος του χρωμοσώματος και έτσι ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μη αμοιβαίων μετατοπίσεων (Donnianni & Symington, 2013).

Οι διχάλες αντιγραφής είναι εύθραυστες δομές του DNA που πρέπει να σταθεροποιηθούν όταν η εξέλιξη της διχάλας αναστέλλεται λόγω βλαβών του DNA.

Σε περιοχές που υπάρχουν σταματημένες διχάλες αντιγραφής συναντώνται εκτεταμένες περιοχές μονόκλωνου DNA (ssDNA) που καλύπτονται από την πρωτεΐνη RPA. Το σύμπλοκο RPA-ssDNA προσελκύει το σύμπλοκο ATR/ATRIP στη διχάλα, ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι ATR, με σκοπό τη σταθεροποίηση και επανεκκίνηση της διχάλας προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων. Η επανεκκίνηση της σταματημένης διχάλας αντιγραφής εξαρτάται από διάφορες DNA ελικάσες και μετατοπάσες συμπεριλαμβανομένων των BLM, WRN, FANCM, HLTf και SMARCA1. Οι διχάλες αντιγραφής που έχουν σταθεροποιηθεί από το μονοπάτι ATR μπορούν να ξεκινήσουν πάλι την αντιγραφή πυροδοτώντας αδρανή σημεία έναρξης της αντιγραφής, αντιστρέφοντας την κατεύθυνση της σταματημένης διχάλας ή ενεργοποιώντας τα μονοπάτια ανοχής της βλάβης (DDT).

Παρόλα αυτά, κάποιες διχάλες αποτυγχάνουν στην επανεκκίνηση και καταρρέουν. Οι μονόκλωνες ρήξεις που συναντώνται από τη διχάλα αντιγραφής μπορούν να μετατραπούν σε δίκλωνες (DSB), προκαλώντας την κατάρρευση της διχάλας. Η κατάρρευση μπορεί επίσης να προκύψει με απευθείας κόψιμο της διχάλας από τη ενδονουκλεάση MUS81/EME1 που ακολουθεί την παύση της αντιγραφής. Σε αυτή την περίπτωση, η δημιουργία των ρήξεων επιφέρει τη δημιουργία ενός δίκλωνου άκρου, το οποίο επιδιορθώνεται μέσω ενός μηχανισμού επιρρεπή σε λάθη, γνωστό ως αντιγραφή επαγόμενη από ρήξη (Break Induced Replication, BIR) (Ciccio & Elledge, 2010; Zeman & Cimprich, 2014).

Ο BIR χρησιμοποιεί μια σειρά από νουκλεάσες και ρεκομπινάσες, ώστε να μπορέσει να βοηθήσει την εισβολή ενός προεξέχοντος 3' άκρου μέσα σε ένα κλώνο αντιμετάθεσης στο πατρικό χρωμόσωμα και με τη βοήθεια της Polδ3 ή της BLM ελικάσης να προχωρήσει στην επανασύνθεση χωρίς να χρειάζεται σημείο έναρξης της αντιγραφής. Πιο συγκεκριμένα για το μηχανισμό, μετά από μια αρχική εκτομή που πραγματοποιείται στο δίκλωνο άκρο (Double Strand Break, DSB), ακολουθεί η εισβολή και υβριδοποίηση του μονόκλωνου άκρου με την ομόλογη προς αυτό αλληλουχία, η οποία μπορεί να εντοπίζεται είτε στην αδερφή χρωματίδη, είτε στο ομόλογο χρωμόσωμα, είτε σε κάποια άλλη χρωμοσωμική περιοχή. Στη συνέχεια, ακολουθεί η σύνθεση του DNA κατά την οποία ο BIR απαιτεί όλους τους παράγοντες αντιγραφής και τις τρεις κύριες DNA πολυμεράσες που απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA. Η πολυμεράση Polδ3 είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA (Lydeard et al, 2007; Llorente et al, 2008), ενώ φαίνεται πως ο μηχανισμός εξαρτάται κυρίως από τη δράση της πρωτεΐνης Rad52 και όχι απαραίτητα από τη δράση της Rad51, όπως συμβαίνει με τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Malkova et al, 1996; Bosco & Haber, 1998; Bai & Symington, 1996).

Μετά την αντιγραφή ενός τμήματος DNA, μονόκλωνη αλυσίδα εκτοπίζεται. Στην περίπτωση που δεν εντοπιστεί κάποιο δεύτερο δίκλωνο άκρο με το οποίο να μπορεί να συνδεθεί, θα ακολουθήσει ένας δεύτερος κύκλος εισβολής. Συνήθως, η διαδικασία της σύνθεσης ολοκληρώνεται στο τέλος του χρωμοσώματος το οποίο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα.

Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε συντηρητικό τρόπο αντιγραφής, ενώ αυτός ο τρόπος αντιγραφής, πέρα από τη διατήρηση του τελομερούς, μπορεί να συμβάλει και στην επιμήκυνση ενός θραυσμένου χρωμοσώματος κατά το στάδιο της αντιγραφής. Μετά τη φάση της αντιγραφής ένα θραυσμένο χρωμόσωμα μπορεί να επιδιορθωθεί

διαχρωμοσωμικά, πάλι μέσω του μηχανισμού BIR και μάλιστα με αυτό το τρόπο μπορεί να επιμηκύνει και το τελομερικό του μήκος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ξανά επιμήκυνση μέσω συντηρητικού τρόπου αντιγραφής (Roumelioti et al, 2016). Φαίνεται ότι αυτοί οι δύο μηχανισμοί μπορούν να δουλεύουν συνεργατικά, αλλά αυτό δεν είναι γνωστό ακόμα.

5. EXD2 (Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2)

Η EXD2 (Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2) είναι μια πρωτεΐνη με ενεργότητα εξωνουκλεάσης 3'-5', η οποία συμμετέχει και αυτή στον μηχανισμό BIR. Η ανακάλυψή της έγινε το 2016, από την ομάδα του Δρ. Wojciech Niedwiedz, ως αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη νουκλεασών του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό. Η EXD2 είναι πολύ σημαντική στην ανταπόκριση των κυττάρων στο στρες αντιγραφής, μιας και ο ρόλος της είναι να αποδομεί τη φουρκέτα της αντιγραφής όταν έχει γίνει αναστροφή του βρόγχου της αντιγραφής. Αποτέλεσμα αυτών είναι η επανεκκίνηση του βρόγχου της αντιγραφής και η αποφυγή της γονιδιακής αστάθειας. Απώλεια της EXD2 οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια και οδηγεί μάλιστα σε συνθετική θνητότητα σε κύτταρα στα οποία λείπει ή είναι μεταλλαγμένη η πρωτεΐνη BRCA1/2. Σε κλινικό επίπεδο επομένως αναστολείς της EXD2 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντίστοιχοι αναστολείς της PARP1 σε καρκίνους που έχουν μεταλλάξεις στις BRCA1/2 (Nieminuszczy et al, 2019).

6. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων DNA και τελομερική ακεραιότητα

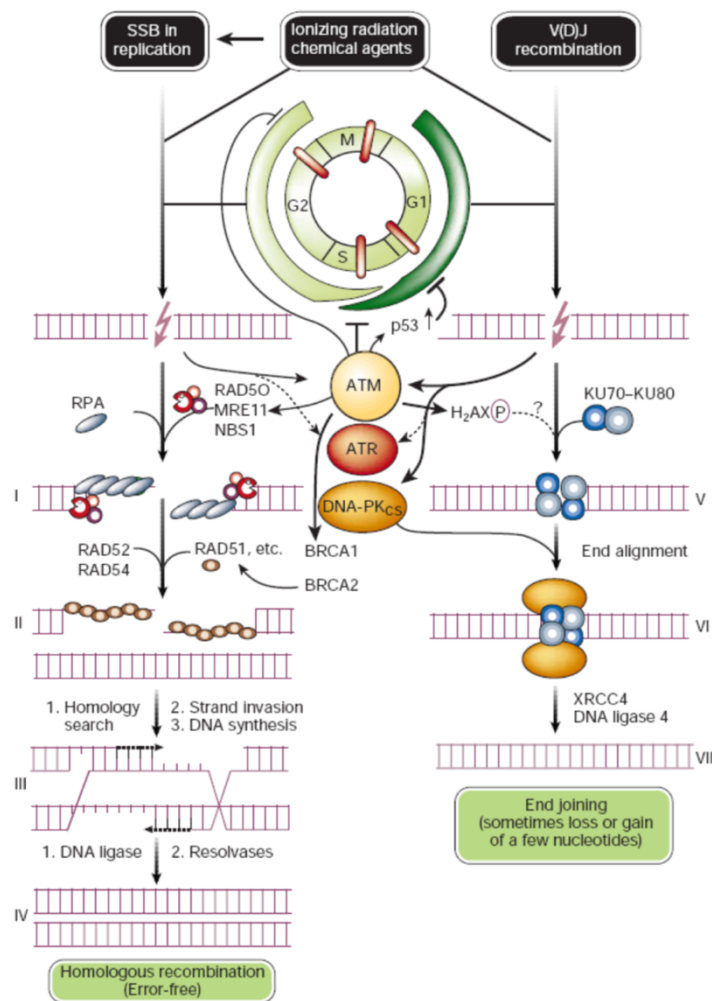
Τα κύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με συνεχές στρες, είτε ενδογενές, για παράδειγμα κατά την αντιγραφή, είτε εξωγενές, κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, από θερμική διάσπαση ουσιών και χημικά μεταλλαξογόνα, που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε βλάβη του DNA. Για να διατηρηθεί η γονιδιωματική ακεραιότητα, τα κύτταρα διαθέτουν ένα οπλοστάσιο πρωτεϊνών επιδιόρθωσης οδηγώντας το κύτταρο στην κατάλληλη οδό αποκατάστασης ή εάν η βλάβη είναι ανεπανόρθωτη, προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή/και απόπτωση. Η απόκριση στη βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR) είναι ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ανιχνεύει τη βλάβη του DNA και ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA για να προστατέψει το κύτταρο. Φαίνεται ότι κύτταρα με ελαττώματα σε αυτούς τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA.

Μελέτες έχουν δείξει μία συσχέτιση ανάμεσα στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και της τελομερικής ακεραιότητας (Bolzan & Bianchi, 2006). Σύμφωνα με αυτή η εμφάνιση τελομερικής δυσλειτουργίας, είτε λόγω απώλειας των τελομερικών πρωτεϊνών, είτε λόγω απώλειας των τελομερικών επαναλήψεων, ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Jacobs & de Lange, 2005; Zhang et al, 2005; Cenci et al, 2005). Πιο συγκεκριμένα τα τελομερή καταφέρνουν να διατηρήσουν την ακεραιότητας τους αλληλεπιδρώντας με διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων του DNA (Double-Strand Breaks, DSB) (Blackburn, 2001; Maser & DePinho, 2004; Slijepcevic & Al-Wahiby 2005; Shay & Wright, 2004). Με αυτό το τρόπο η ύπαρξη δυσλειτουργικών τελομερών επάγει

απόκριση ανάλογη με αυτή που παρατηρείται με την ύπαρξη δίκλωνων θραύσεων του DNA (Takai et al, 2003; Wright & Shay, 2005).

Γενικότερα οι δίκλωνες θραύσεις είναι βλάβες απειλητικές για τη ζωή και μπορούν να οδηγήσουν σε αναδιατάξεις στο γονιδίωμα, απώλεια γενετικής πληροφορίας, χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, ακόμα και κυτταρικό θάνατο, αν αυτές δεν επιδιορθωθούν (Bhattacharjee & Nandi, 2016). Εκτός από εξωτερικούς παράγοντες, τέτοιου είδους θραύσεις μπορούν να προκληθούν και από φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων, ο ανασυνδυασμός κατά τη μείωση ή ο «ανταγωνισμός» μεταξύ αντιγραφής και μεταγραφής του DNA (Aguilera & Gaillard, 2014; Mehta & Haber, 2014; Syeda et al, 2014). Η επιδιόρθωσή τους κρίνεται αναγκαία για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος.

Η επιδιόρθωση των DSBs μπορεί να πραγματοποιηθεί με τέσσερα τουλάχιστον ανεξάρτητα μονοπάτια: τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination, HR), τον κλασικό μηχανισμό σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Classical Non Homologous End Joining, Classical NHEJ), τον εναλλακτικό μηχανισμό σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (alternative-NHEJ ή alt-NHEJ) και τον υβριδισμό εκτεθειμένων μονόκλωνων άκρων (single-strand annealing, SSA). Επομένως, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των DSBs μπορούν να χωριστούν σε δύο γενικότερες κατηγορίες αναλόγως με το αν απαιτείται ομόλογη αλληλουχία για την επιδιόρθωση. Ο μη-ομόλογος ανασυνδυασμός των άκρων των χρωμοσωμάτων, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, δεν εξαρτάται από την ομολογία της θραυσμένης αλληλουχίας και είναι ο βασικός μηχανισμός επιδιόρθωσης κατά τις G0 και G1 φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Chiruvella et al, 2013). Από την άλλη πλευρά, ο ομόλογος ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μέσω της ανταλλαγής πανομοιότυπων ή μερικώς όμοιων αλληλουχιών (San Filippo et al, 2008) και είναι ο κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA κατά τις S και G2 φάσεις του κυτταρικού κύκλου, όπου και πραγματοποιείται η αντιγραφή, καθώς χρησιμοποιεί αλληλουχίες των αδελφών χρωματίδων (με πλήρη ομολογία) ως πρότυπο για να πραγματοποιήσει πιστή επιδιόρθωση (San Filippo et al, 2008; Bhattacharjee & Nandi, 2016).



Εικόνα 7: Μηχανισμοί επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων DNA. Ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) και Μη ομόλογη ένωση ελεύθερων άκρων (NHEJ) (Nature, Vol 411, 17 May 2001)

6.1 Ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR)

Ο HR ξεκινά πάντα από τη δημιουργία μονόκλωνου DNA, που προάγεται από διάφορες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου του συμπλέγματος MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Σε γεγονότα που καταλύονται από την RAD51 και τις πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2, το μονόκλωνο DNA εισβάλλει στο ανέπαφο δίκλωνο συμπληρωματικό DNA και αφού ακολουθήσουν οι δράσεις πολυμερασών, νουκλεασών, ελικάσών και άλλων συστατικών πραγματοποιείται η επέκταση του DNA και η διάλυση του υποστρώματος. Ο HR, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 4, χρησιμοποιείται επίσης για την επανεκκίνηση σταματημένων διχαλών αντιγραφής και την επιδιόρθωση crosslinks μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων (Jackson & Bartek, 2009).

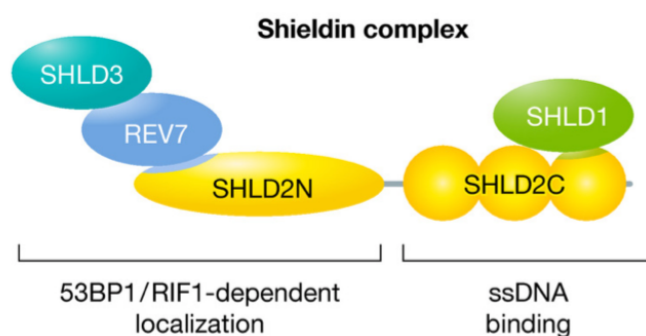
6.2 Μηχανισμός σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Classical Non Homologous End Joining, Classical NHEJ)

Ο κλασικός μηχανισμός σύνδεσης μη ομόλογων άκρων (NHEJ), από την άλλη μεριά, αποτελεί τον κύριο μηχανισμό επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ορίζεται ως ο μηχανισμός επιδιόρθωσης κατά τον οποίο δύο DSBs ενώνονται με απευθείας ευθυγράμμιση των αλυσίδων τους, δημιουργώντας περιοχές σύνδεσης με καθόλου ή ελάχιστη ομολογία. Για την εύρυθμη λειτουργία του απαραίτητα είναι μια σειρά πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (Chiruvella et al, 2013), ενώ μέσω της διαδικασίας πιθανό είναι να δημιουργηθούν μικρές αφαιρέσεις ή προσθήκες νουκλεοτιδίων (Daley

et al, 2005; Ma et al, 2005). Για το λόγο αυτό, η διαδικασία θεωρείται πως επιτρέπει τη δημιουργία λαθών στην αλληλουχία του DNA. Στο NHEJ οι δίκλωνες θραύσεις αναγνωρίζονται από το ετεροδιμερές Ku (Ku70 και Ku80), το οποίο προσδένεται σε αυτές και ενεργοποιεί την κινάση DNA-PKcs για να ξεκινήσει ο μηχανισμός επιδιόρθωσης. Η κινάση DNA-PKcs παίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθεροποίηση των άκρων στις δίκλωνες θραύσεις και στην αποφυγή της εκτομής τους μέσω μιας σειράς φωσφορυλιώσεων (Ciccía & Elledge, 2010).

6.3 Σύμπλοκο Shieldin

Για την επιλογή του επιδιορθωτικού μονοπατιού που θα ακολουθηθεί, ομόλογου ανασυνδυασμού ή μη ομόλογης ένωσης των άκρων του DNA, σημαντικό ρόλο παίζει το μόριο 53BP1. Κατά τη φάση G1, το 53BP1 προωθεί το κλασικό NHEJ έναντι της εναλλακτικής σύνδεσης (Ceccaldi et al, 2016; Chapman et al, 2013; Escribano-Dí az et al, 2013), ενώ κατά τις φάσης S/G2 προστατεύει τα DSBs από υπερεκτομή (Ochs et al, 2016). Σε φυσιολογικά πλαίσια το 53BP1 αλληλοεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες RIF1 και REV7 προάγει τον NHEJ και τη διατήρηση των τελομερών. Παρά τους σημαντικούς ρόλους τους στην επιδιόρθωση των DSBs όμως, λίγα είναι γνωστά ακόμα για τη δραστηριότητα αυτών των μορίων, αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Η πρόσφατη ανακάλυψη της Shieldin, ενός συμπλόκου πρωτεϊνών τεσσάρων υπομονάδων με δραστικότητα μονόκλωνης δέσμησης στο DNA, έφερε στο φως νέα δεδομένα για το μονοπάτι αλληλεπίδρασης με την 53BP1. Το σύμπλοκο Shieldin αποτελείται από την REV7, η οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά στο μονοπάτι της 53BP1 και άλλες τρεις πρωτεΐνες, οι οποίες δεν είχαν χαρακτηριστεί προηγουμένως, C20orf196 (SHLD1), FAM35A (SHLD2) και CCTC-534A2.2 (SHLD3). Το Shieldin φαίνεται να προωθεί πολλές δραστηριότητες που σχετίζονται με το 53BP1, όπως η προστασία των άκρων του DNA και η μη ομόλογη σύζευξη (Setiapatra & Durocher, 2019). Ωστόσο, πολλά μένουν ακόμα να διερευνηθούν για τη σαφή κατανόηση της λειτουργίας αυτού του συμπλόκου.



Εικόνα 8: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών του συμπλόκου Shieldin. Οι SHLD3 και REV7, συνδέονται με το άκρο SHLD2 N, σχηματίζοντας την ενότητα εντοπισμού που εξαρτάται από τα 53BP1 και RIF1. Εν το μεταξύ, το SHLD1 συνδέεται με το άκρο SHLD2 C, σχηματίζοντας τη μονάδα σύνδεσης ssDNA (Setiapatra & Durocher, 2019).

7. Τελομερική αστάθεια και χρωμοσωμική δυσλειτουργία στον καρκίνο

Ένα βασικό χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των καρκίνων στον άνθρωπο είναι η γενωμική αστάθεια, η οποία προκαλείται από μεταλλάξεις είτε κληρονομικές, σε

γονίδια που παρακολουθούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος, είτε επίκτητες σε σωματικά κύτταρα κατά την ανάπτυξη του όγκου. Οι γενετικές αλλαγές που προκύπτουν μπορούν να εμφανιστούν σε διάφορα επίπεδα, για παράδειγμα σε νουκλεοτίδια, σε μικρά τμήματα DNA (μικροδορυφόροι), σε ολόκληρα γονίδια, σε δομικά συστατικά των χρωμοσωμάτων ή ολόκληρα χρωμοσώματα. Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN-Chromosomal Instability in Neoplasia) είναι η πιο διαδεδομένη μορφή γενωμικής αστάθειας στη νεοπλασία και οδηγεί σε αλλαγές στη δομή αλλά και στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (Rajagopalan et al, 2004). Οι τυχαίες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, συνεισφέρουν δραματικά στην εσωτερική γενετική ετερογένεια του όγκου και είναι κυρίως υπεύθυνες για την εξέλιξη του καρκίνου (Gagos & Irminger, 2005). Τα αποτελέσματα της χρωμοσωμικής αστάθειας στη νεοπλασία είναι η καρυοτυπική αστάθεια, με συγχρόνως αύξηση διαφορετικών υποπληθυσμών του όγκου (Christodoulidou et al. 2013). Επίσης, η CIN σχετίζεται με προχωρημένες και ανιάτες μορφές κακοήθειας, καθιστώντας περίπλοκη την οποιαδήποτε ογκοθεραπευτική στρατηγική (Roschke & Kirsch, 2010). Η κατανόηση του μηχανισμού της CIN λοιπόν μπορεί να προσφέρει νέα εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα που θα είναι ικανά να νικήσουν τους προχωρημένους καρκίνους (Stratton, 2011).

Ο συνεχής πολλαπλασιασμός των καρκινικών κύτταρων που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, χαρακτηρίζεται από υψηλούς ρυθμούς δομικής αστάθειας των χρωμοσωμάτων. Αυτό συμβαίνει λόγω της ανεπαρκούς τελομερικής προστασίας και συνεπώς στην επιδεκτικότητά τους σε τυχαίες τελομερικές συνδέσεις (Muntoni & Reddel, 2005). Οι συντήξεις αυτές οδηγούν σε ένα φαινόμενο γενωμικής αστάθειας που ονομάζεται «κύκλοι χρωμοσωμικών Θραύσεων/Συντήξεων/Γεφυρών (chromosomal Breakage/ Fusion/ Bridge- κύκλοι B/F/B)» και περιγράφηκε για πρώτη φορά από την Barbara Mc Clintock (Mc Clintock, 1941). Το φαινόμενο αυτό έχει θεωρηθεί ως γενεσιουργός παράγοντας ανωμαλιών του γενετικού υλικού κατά τη νεοπλασία, καθώς οδηγεί σε ανασυνδυασμούς μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων (αντιμεταθέσεις), διπλασιασμούς, ή/ και αναστροφές των μορίων του DNA (Gisselsson et al, 2000; Sabatier et al, 2005; Selvarajah et al, 2006). Οι δομικές διαταραχές των χρωμοσωμάτων είναι πολύ συχνές στις ανθρώπινες κακοήθειες καθώς συναντώνται στο 90-95% των ανθρώπινων όγκων και αιματολογικών κακοηθειών (Rajagopalan et al, 2004).

8. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών βιογένεσης και επιδιόρθωσης της τελομερικής και χρωμοσωμικής ευθραυστότητας, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο ποντίκι. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση δύο μη καλά χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που συνδέονται με τον NHEJ, των SHLD1 και SHLD2 στη χρωμοσωμική αστάθεια και τη χρωμοσωμική ευθραυστότητα, μετά την επίδραση κυτταροτοξικών παραγόντων. Έπειτα στόχος ήταν η μελέτη του εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών και η σχέση του με τον μηχανισμό BIR. Πιο συγκεκριμένα διερευνήθηκε ο ρόλος της ρεκομπινάσης RAD52 και της ελάχιστα γνωστής εξωνουκλεάσης EXD2, στη γονιδιωματική ακεραιότητα καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται απουσία τελομεράσης μέσω του μονοπατιού ALT. Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της δεσμίνης στη

δημιουργία εύθραυστων τελομερών σε βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού, έναν φαινότυπο ο οποίος σχετίζεται με τον μηχανισμό BIR.

B. Υλικά και μέθοδοι

1. Διατήρηση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό υλικό: Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1x (DMEM) [Gibco], Βόειος εμβρυικός ορός αίματος 10%v/v (Fetal Bovine Serum-FBS) [Gibco], Πενικιλίνη 10 mg/mL [Sigma], Στρεπτομυκίνη 10 mg/mL [Invitrogen]
- 1x PBS: 10x PBS [Gibco] αραιωμένο σε ddH₂O
- Θρυψίνη 1x : θρυψίνη 10x [Sigma] αραιωμένη σε 1xPBS
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide – DMSO) [SIGMA]

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές «αθανατοποιημένων» ανθρώπινων κυττάρων δηλαδή μετασχηματισμένα κύτταρα συγκεκριμένων ιστών τα οποία συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται in-vitro εφόσον τους παρέχονται οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά RPE1 ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, η καρκινική σειρά ανθρώπινου επιθηλιακού οστεοσαρκώματος U2OS και CSP βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού.

Πιο συγκεκριμένα, οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Κύτταρα RPE1 αγρίου τύπου
- Κύτταρα RPE1 SHLD1 KO, τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SHLD1
- Κύτταρα RPE1 SHLD2 KO (κλώνος 1 και κλώνος 2), τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SHLD2
- Κύτταρα U2OS αγρίου τύπου
- Κύτταρα U2OS EXD2 KO, τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη EXD2
- Κύτταρα U2OS RAD52 KO, τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη RAD52
- Κύτταρα U2OS EXD2 KO siSMARCAL1, τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη EXD2, ενώ παράλληλα έχει αποσιωπηθεί η SMARCAL1
- Κύτταρα U2OS EXD2 KO siMus81, τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη EXD2, ενώ παράλληλα έχει αποσιωπηθεί η Mus81
- Κύτταρα CSP ενήλικου ποντικού (90D mice) αγρίου τύπου
- Κύτταρα CSP des^{-/-} ενήλικου ποντικού (90D mice), τα οποία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη δεσμίνη

Τα κύτταρα U2OS και RPE1 αποτελούν ευγενική χορηγία και παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του καθηγητή Δρ. Wojciech Niedzwiedz (Institute of Cancer Research, London), ενώ τα CSP προέρχονται από το εργαστήριο της καθηγήτριας Δρ. Γιασεμής Καπετανάκη (Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών).

1.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε DMEM θρεπτικό υλικό, συμπληρωμένο με 10% (v/v) ορό αίματος βόειου εμβρύου (FBS). Για την προστασία των καλλιιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις των 100 µg/mL πενικιλίνη και 100 µg/mL στρεπτομυκίνη (Invitrogen). Το διάλυμα ορού αίματος βόειου εμβρύου (FBS) απενεργοποιείται με την επώασή του σε θερμοκρασία 65°C για 30 min. Η παρασκευή του υλικού καλλιέργειας, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, ενώ η μορφολογία και η ανάπτυξη των κυττάρων παρατηρούνται με χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% (v/v) CO₂, με αλλαγή θρεπτικού υλικού κάθε 48-72 ώρες.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν καλούνται adherent cells λόγω της ιδιότητάς τους να προσκολλώνται στον πυθμένα των φλασκών και να συγκροτούν μονοστιβάδες. Όταν καλύψουν το 85-95% του εμβαδού της επιφάνειας της φλάσκας δημιουργούν ογκίδια και συσσωματώνονται. Για την αποφυγή αυτών των φαινομένων απαιτείται ανακαλλιέργεια. Κατά τη διαδικασία αυτή απορρίπτεται το υπερκείμενο της φλάσκας και πραγματοποιείται μία πλύση με PBS 1x, προστίθεται διάλυμα θρυψίνης, περιεκτικότητας 1% (w/v) θρυψίνης σε 1x PBS (Invitrogen) και επωάζονται για 3 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας, λόγω της θρυψίνης που πέπτει παροδικά τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων και συγκεντρώνονται στο υπερκείμενο. Μετά την προσθήκη DMEM που απενεργοποιεί τη θρυψίνη τα κύτταρα αναδεύονται και συλλέγονται σε falcon (15 mL). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Ένα ποσοστό του διαλύματος αυτού επιστρέφεται σε νέες φλάσκες για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων αυτών. Το υπόλοιπο υλικό απορρίπτεται.

1.2 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ειδικά αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια (cryo-vials) στους -80°C απ' όπου μπορούν να αποψυχθούν και να αναπτυχθούν ξανά σε καλλιέργεια. Για την τεχνική αυτή, τα κύτταρα, αμέσως πριν καταψυχθούν, αφαιρούνται από τη φλάσκα, με την ίδια μέθοδο που γίνεται και η ανακαλλιέργειά τους, όμως στη διαδικασία αυτή μετά το στάδιο της φυγοκέντρησης, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε ένα διάλυμα που αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO, το οποίο δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας για τα κύτταρα.

Για τη διαδικασία απόψυξης, τα cryo-vial μεταφέρονται από τους -80°C σε υδατόλουτρο των 37°C όπου και ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση. Αφού ολοκληρωθεί η απόψυξη του περιεχομένου του φιαλιδίου πραγματοποιείται μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα τύπου falcon με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, το οποίο μεταφέρεται σε φλάσκα 25 cm².

2. Συλλογή μεταφασικών χρωμοσωμάτων

Υλικά

- N-διακετυλ-N-μέθυλ-κολχικίνη (Colcemid) 0,1 µg/mL [Gibco]
- Μεθανόλη, CH₃OH [Applichem]
- Οξικό οξύ, CH₃COOH [Merck]
- Υποτονικό διάλυμα: KCl 0,0075 M [Sigma]

Για τη λήψη μεταφασικών χρωμοσωμάτων, οι λογαριθμικά αυξανόμενες κυτταρικές καλλιέργειες εκτίθενται στην ουσία N-διακετυλ-N-μεθυλ-κολχικίνη τελικής συγκέντρωσης 10 µL/mL, ένα παράγωγο της κολχικίνης λιγότερο τοξικό, το οποίο διακόπτει το πολυμερισμό των μικροσωλινίσκων της μιτωτικής ατράκτου στο στάδιο της μετάφασης. Η διάρκεια της επώασης στη κολχικίνη σχετίζεται με το κυτταρικό τύπο. Στα RPE1 κύτταρα η επώαση διαρκεί είκοσι λεπτά, ενώ στα U2OS μία ώρα στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα κύτταρα συλλέγονται, ύστερα από αποκόλλησή τους με διάλυμα 1% θρυψίνης και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1000 στροφές. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται, σταγόνα σταγόνα, 5mL υποτονικού διαλύματος KCl, το οποίο προκαλεί τη λύση των κυττάρων, μέσω οσμωτικών φαινομένων, και την απελευθέρωση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη σταγόνα σταγόνα 1 mL μονιμοποιητικού διαλύματος (3:1 CH₃OH/CH₃COOH), ήπια ανάδευση με γυάλινη πιπέτα Pasteur και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 1000 στροφές. Ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις, μία με 5 mL και δύο με 3 mL μονιμοποιητικού διαλύματος, όπου κάθε μία ακολουθείται από φυγοκέντρωση στις συνήθεις συνθήκες. Το ίζημα φυλάσσεται στους 4°C με σκοπό την επίστρωση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.

Για την παρασκευή κυτταρογενετικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρες πλάκες το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται με κατάλληλη ποσότητα μονιμοποιητικού διαλύματος για την παραλαβή ενδιάμεσης πυκνότητας εναιωρήματος κυττάρων. Στη συνέχεια καθαρές αντικειμενοφόρες πλάκες πλένονται με μονιμοποιητικό διάλυμα και ενχύονται από απόσταση 2-3 σταγόνες εναιωρήματος κυττάρων, παρουσία υγρασίας. Εν συνεχεία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύονται στους 4°C.

3. Κατασκευή Καρυοτύπου για τη μελέτη δομικών και αριθμητικών μεταλλαγών

Τα μεταφασικά χρωμοσώματα ενός κυττάρου μπορούν να μελετηθούν με την κατασκευή καρυοτύπου. Ο καρυότυπος είναι η απεικόνιση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων ενός κυττάρου σε ζεύγη κατά ελαττούμενο μέγεθος. Από τη μελέτη και την περιγραφή του καρυοτύπου ενός οργανισμού μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για το είδος στο οποίο ανήκει ένας οργανισμός, το φύλο του οργανισμού καθώς και την ύπαρξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

Η μελέτη των χρωμοσωμάτων είναι δυνατή μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα κατά το στάδιο της μετάφασης, όπου τα χρωμοσώματα χαρακτηρίζονται από μέγιστη συσπείρωση και είναι ορατά σαν μενονωμένες δομές στο οπτικό μικροσκόπιο.

Η εργαστηριακή διαδικασία κατασκευής καρυοτύπου ξεκινά με τη συγκομιδή των κυττάρων όταν αυτά έχουν φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο και τη συλλογή

μεταφασικών χρωμοσωμάτων, με τη διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως. Μετά την επίστρωση των χρωμοσωμάτων σε αντικειμενοφόρες πλάκες, ακολουθεί η χρώση των παρασκευασμάτων με συγκεκριμένες χρωστικές για τη δημιουργία ζωνών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα DAPI 0,1μg/mL & Vectashield για τη χρώση των χρωμοσωμάτων. Ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο και ανάλυση του αριθμού και της δομής των χρωμοσωμάτων για κάθε κύτταρο που ελέγχεται. Οι ψηφιακές εικόνες βγήκαν με τον 63X φακό και με τη χρήση της CCD κάμερας στο μικροσκόπιο Zeiss Axio-Imager Z1 (Zeiss) και με τη βοήθεια του προγράμματος Isis Metasystems.

4. Φθορίζοντας in-situ υβριδισμός- FISH στα τελομερή (PNA-FISH)

Οι PNA (Peptide Nucleic Acid) ανιχνευτές είναι συνθετικά πολυμερή, παρόμοια των DNA/RNA ανιχνευτών, στους οποίους ο σακχαροφωσφορικός σκελετός έχει αντικατασταθεί από επαναλαμβανόμενα, ουδέτερα μόρια N-(2-αμινοαιθυλ)-γλυκίνης, ενωμένα με πεπτιδικό δεσμό. Τα οφέλη των PNA ανιχνευτών έγκειται στο σχηματισμό ισχυρότερων δεσμών μεταξύ PNA/DNA, σε σχέση, με αυτόν που σχηματίζεται μεταξύ DNA/DNA, εξαιτίας της απουσίας ηλεκτροστατικών απώσεων, καθώς επίσης και στη δυσκολία αναγνώρισης τους από νουκλεάσες. Η ιδιότητα αυτή τους καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτικούς στην αποδόμηση.

Υλικά

- RNase 100 μg/mL σε PBS 1x [Roshe]
- Διάλυμα Φορμαλδεΐδης 3,7%: Φορμαλδεΐδη 100% [CarloErba] αραιωμένη σε TBS 1x
- 1xTBS: 10xTBS (Tris-HCl 0,5 M pH 7,6, NaCl [Sigma] 1,5 M) αραιωμένο σε ddH₂O
- Διάλυμα προεργασίας: HCl 0,01 M – πεψίνη 0,02% [Applichem]
- PNA τελομερικοί ανιχνευτές (Probes) 10 μM: Red – Cy3-σημασμένοι (TTAGGG)₃, Green – FITC-σημασμένοι (CCCTAA)₃ [Biosynthesis]
- Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10 mM, φορμαμίδιο 70% [Cytocell]
- Διαλύματα αιθανόλης, CH₃CH₂OH: 70%, 85%, 96%
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,05% σε pH 7-7,5
- 1xPBS: 10xPBS [Gibco] αραιωμένο σε ddH₂O
- Διάλυμα DAPI 0,1μg/mL & Vectashield [Vector Laboratories]

Τα κυτταρολογικά παρασκευάσματα ενυδατώνονται με διάλυμα 1x PBS για 5 λεπτά και στη συνέχεια επώζονται για 1 ώρα στους 37°C με 100 μL διαλύματος RNase/πλακάκι. Μετά το πέρας της 1 ώρας, μεταφέρονται σε 1x PBS για 1-2 λεπτά με σκοπό την αφαίρεση της καλυπτρίδας και στη συνέχεια σε διάλυμα 1x TBS για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί εμβύθιση σε φορμαλδεΐδη 3,7% για 2 λεπτά ακριβώς και δύο πλύσεις με 1x TBS για 5 λεπτά η καθεμία. Προκειμένου να απομακρυνθούν οι ιστόνες και να «ανοίξουν» τα χρωμοσώματα, τα πλακάκια εμβαπτίζονται σε προθερμασμένη κυβέτα στους 37°C που φέρει πεψίνη και αφήνονται για 10 λεπτά. Ακολουθούν δύο πλύσεις των 5 λεπτών σε 1x TBS και αφυδάτωση των παρασκευασμάτων σε αυξανόμενης συγκέντρωσης παγωμένη αιθανόλη (70%, 85% και 100%). Ο τελομερικός ανιχνευτής προστίθεται στα δείγματα αραιωμένος σε διάλυμα υβριδισμού τελικού όγκου 10 μL/πλακάκι. Παρουσία του ανιχνευτή, τα

δείγματα επωάζονται στους 80°C για 5 λεπτά και έπειτα για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία υγρασίας.

Μετά το πέρας της υβριδοποίησης τα πλακάκια τοποθετούνται σε κυβέτα που περιέχει προθερμασμένο διάλυμα έκπλυσης, στους 65°C για 10 λεπτά. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 1x PBS στο σκοτάδι και υπό ανάδευση για 10 λεπτά η κάθε μία, αφυδάτωση με μία σειρά από παγωμένες αιθανόλες συγκέντρωσης 70%, 85% και 100% για 2 λεπτά κάθε φορά και τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα. Τέλος, τα παρασκευάσματα καλύπτονται με DAPI και τοποθετείται σε αυτά καλυπτρίδα, για να αποθηκευτούν στους 4°C.

5. Προσδιορισμός του χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού με φθορίζοντα in-situ υβριδισμό (CO-FISH)

Υλικά

- BrdU/C [Sigma]
- Hoechst 33258 (0,5 µg/mL) [Sigma] σε 2x SSC
- 1xPBS [Gibco]
- Εξωνουκλεάση – EXOIII [New England Biolabs]
- Διαλύματα αιθανόλης, CH₃CH₂OH: 70%, 85%, 95%, 100%
- Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10 mM, φορμαμίδιο 70% [Cytocell]
- PNAτελομερικοί ανιχνευτές (Probes) 10 µM: Red – Cy3-σημασμένοι (TTAGGG)₃, Green – FITC-σημασμένοι (CCCTAA)₃ [Biosynthesis]
- Διάλυμα έκπλυσης I: Φορμαμίδιο 70%, BSA 0,1%, H₂O, Tris-HCl 10mM pH 7-7,5
- Διάλυμα έκπλυσης II: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 0.08%, pH 7.4
- Διάλυμα DAPI 0,1µg/mL & Vectashield [Vector Laboratories]

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αποδόμηση των νεοσυντιθέμενων κλώνων των τελομερών, με τη χρήση BrdU/C, και τον υβριδισμό των πατρικών με τους ειδικούς τελομερικούς ανιχνευτές μονής κατεύθυνσης.

Πριν γίνει η συλλογή των κυττάρων, προστίθεται στις καλλιέργειες κατάλληλη ποσότητα BrdU/C και παραμένει για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (~ 40-46 ώρες), το οποίο εξαρτάται από την κυτταρική σειρά. Τα ανάλογα της κυτοσίνης και της θυμίνης (βρωμοουριδίνη και βρωμοκυτοσίνη) ενσωματώνονται στη διπλή έλικα κατά την αντιγραφή του DNA. Για να έχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα τα κύτταρα πρέπει να ενσωματώσουν την ουσία κατά την αντιγραφή του γενετικού υλικού για δύο κύκλους αντιγραφής και να γίνει συλλογή τους, πριν προχωρήσουν σε ένα τρίτο κύκλο διαίρεσης. Τα κύτταρα που έχουν προχωρήσει σε δεύτερο κύκλο αντιγραφής, μετά τον υβριδισμό τους με τους ανιχνευτές, εμφανίζουν κίτρινα σήματα.

Μετά τη συλλογή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται με 1x PBS για 10 λεπτά και στη συνέχεια επωάζονται με διάλυμα RNAase για 1 ώρα στους 37°C. Ακολουθεί ακόμα μία πλύση με 1x PBS για την αφαίρεση της καλυπτρίδας και επώαση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα Hoechst 33258 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι. Ακολουθεί έκθεση σε UV ακτινοβολία (0,180 J, 365 nm) για 45 λεπτά. Η Hoechst αλληλεπιδρά με τα μόρια της BrdU/C και με την επίδραση της UV ακτινοβολίας δημιουργούνται σπασίματα στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Στη συνέχεια, αφού προηγηθεί ακόμα μία πλύση με 1x PBS,

προστίθεται εξωνουκλεάση III (δράση 5'-3') για 30 λεπτά, η οποία εντοπίζει τις περιοχές του DNA, όπου υπάρχουν τα σπασίματα και κατακερματίζει τον νεοσυντιθέμενο κλώνο. Το πρώτο στάδιο ολοκληρώνεται με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 85% και 100%) για 2 λεπτά κάθε φορά και τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν καλά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η διαδικασία συνεχίζεται με το στάδιο του υβριδισμού, όπου σε κάθε πλακάκι προστίθενται 0,05 μ L κόκκινου ανιχνευτή διαλυμένα σε 10 μ L διαλύματος υβριδισμού και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες σκότους και υγρασίας. Μετά το πέρας της μίας ώρας, οι πλάκες εκπλένονται με 1x PBS για την αφαίρεση των καλυπτρίδων και στη συνέχεια προστίθενται 0,16 μ L πράσινου ανιχνευτή διαλυμένα σε 10 μ L διαλύματος υβριδισμού, ο οποίος παραμένει στις ίδιες συνθήκες για 1 ώρα. Ακολουθούν πλύσεις με διαλύματα έκπλυσης I (2 φορές για 15 λεπτά η κάθε μία) και II (3 φορές για 10 λεπτά η κάθε μία), με 1x PBS (3 φορές για 10 λεπτά η κάθε μία) και αφυδάτωση των πλακών με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 95% και 100%) για 2 λεπτά κάθε φορά. Τέλος, τα κυτταρολογικά παρασκευάσματα αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται DAPI.

6. Μικροσκοπική παρατήρηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία απαιτήθηκε η χρήση των ακόλουθων μικροσκοπίων:

- α. Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (Zeiss) για τη παρατήρηση των καλλιεργούμενων κυττάρων,
- β. Ορθό μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss) για τη παρατήρηση και φωτογράφιση των παρασκευασμάτων της τεχνικής FISH

Σε όλα τα πειράματα με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio-ImagerZ1 [Zeiss] και η επεξεργασία τους έγινε με ειδικό πρόγραμμα ανάλυσης φθορισμού (ISIS) της εταιρίας MetaSystems. Όλες οι ψηφιακές εικόνες βγήκαν με φακό 63x, παρουσία ειδικού ελαίου (κεδρέλαιο), και με χρήση CCD κάμερας.

7. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Excel, για τον υπολογισμό της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και του τυπικού σφάλματος, και MINITAB για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια της ανάλυσης paired t-test.

8. Ανοσοσύτωση κατά WESTERN

Υλικά

- Ripa Lysis Buffer 1x [Millipore]
- Διάλυμα φόρτωσης 5x (3 mL 20% SDS, 3,75 ml 1M Tris buffer 6,8 pH, 9 mg μπλε της βρωμοφαινόλης, 2,4 ml β-μερκαπταιθανόλη, 4,5 ml γλυκερόλη, 3,75 ml ddH₂O)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 10 ml 10% SDS, 100 ml 10x Tris-Glycine σε 890 ml ddH₂O

- Διάλυμα μεταφοράς (3 g Tris, 14.4 g γλυκίνη και 20% μεθανόλη)
- Χαρτιά Whattman 3MM
- Μεμβράνη PVDF
- Διάλυμα TBS-T (900 ml H₂O, 1 ml Tween, 100 ml 10x TBS)
- Παρεμποδιστικό ρυθμιστικό διάλυμα (2,5 g BSA σε 50 ml TBS-T)
- Anti-cyclin E Antibody (E-4), sc-377100, mouse monoclonal IgG [Santa Cruz Biotechnology]
- β-Actin (8H10D10) Mouse mAb #3700 [Cell signaling]
- Anti-mouse IgG HRP-linked antibody [Cell signaling]
- Διάλυμα ECL [ECL. Thermo Scientific]
- Φιλμ αυτοραδιογραφίας [Fuji Film, Fuji medical X-Ray film]
- Γυάλινη μήτρα (συσκευή ηλεκτροφόρησης mini protein Bio-Rad), για τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό Biorad PowerPac Basic
- Συσκευή XCell II Blot Module, για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

8.1 Απομόνωση και αποδιάταξη πρωτεϊνών από ίζημα κυττάρων

Κυτταρικό ίζημα λύεται με την προσθήκη RIPA Lysis Buffer 1x ύστερα από επώαση 2 ωρών με κίνηση σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 13300 στροφές, απομόνωση του υπερκευμένου και προσθήκη σε αυτό ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 5x (3 ml 20% SDS, 3,75 ml 1M Tris buffer 6,8 pH, 9 mg μπλε της βρωμοφαινόλης, 2,4 ml β-μερκαπταιθανόλη, 4,5 ml γλυκερόλη, 3,75 ml dH₂O). Η αναλογία πρωτεϊνών και διαλύματος φόρτωσης είναι ένα προς πέντε, δηλαδή σε τελικό όγκο 150 μl δείγματος αντιστοιχούν 120 μl πρωτεϊνών και 30 μl 5x διαλύματος φόρτωσης. Στη συνέχεια, ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους 100°C για 10 λεπτά.

Το απορρυπαντικό SDS χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε επιμέρους πολυπεπίδια. Όταν ένα μίγμα πρωτεϊνών θερμαίνεται στους 100 °C παρουσία SDS, αλληλεπιδρά με το πολυπεπτιδικό σκελετό σταθερά σε αναλογία 1.4 g/g πολυπεπτιδίου. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα φυσικά φορτία των πολυπεπτιδίων γίνονται αμελητέα συγκριτικά με το αρνητικό φορτίο του SDS. Έτσι, τα πολυπεπίδια αποκτούν μία ομοιόμορφη πυκνότητα αρνητικού φορτίου, που είναι ίδια ανά μονάδα μήκους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα τέτοιων πρωτεϊνών είναι μια γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου των μοριακών τους βαρών.

Η β-μερκαπταιθανόλη είναι ένα αναγωγικό μέσο που χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών εξασφαλίζοντας ότι, μια πρωτεΐνη θα είναι πλήρως αποδιαταγμένη πριν φορτωθεί στο πήκτωμα.

Προκειμένου τα δείγματα να σταθεροποιηθούν στον πυθμένα του πηγαδιού φόρτωσης στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, προστίθεται σε αυτά γλυκερόλη, η οποία έχει την ικανότητα να αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων.

8.2 Ηλεκτροφόρηση και Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τα μοριακά βάρη, τα ισοηλεκτρικά σημεία, τις αλληλεπιδράσεις και άλλες φυσικές ιδιότητες ή ακόμα και την ποσοτική εκπροσώπηση ορισμένων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών ζωνών, όχι όμως και την ταυτοποίησή τους. Συγκεκριμένες πρωτεΐνες

μπορούν να ανιχνευθούν και να τακτοποιηθούν μετά το διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση μίας ή δύο διαστάσεων, στην περίπτωση που υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα έναντι αυτών των πρωτεϊνών. Γι' αυτό το σκοπό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες. Ωστόσο, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη είναι αυτή του ανοσοαποτύπωματος (ή μεταφοράς) κατά Western.

Το ανοσοαποτύπωμα (ή ανοσοστύπωμα) των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνυσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα ανοσο-αποτύπωσης πχ. ανοσοαποτύπωμα κηλίδας (dot blot) και δυσδιάστατη ανοσοαποτύπωση (2D blot), αλλά το γνωστότερο είναι το κλασσικό ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting).

Κατά την ηλεκτροφόρηση ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος, μετά από την κάλυψη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων με αρνητικά φορτισμένο SDS. Μετά την ετοιμασία των δειγμάτων με την κατάλληλη επεξεργασία τους ακολουθεί φόρτωση στο πήκτωμα ακρυλαμίδης και τρέξιμο με ενεργοποίηση ηλεκτρικού πεδίου υπό σταθερή τάση ή σταθερή ένταση.

Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται η ταυτοποίηση μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών με την τεχνική του στυπώματος (ή της μεταφοράς) Western (Western blotting). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, όλες οι πρωτεΐνες ενός πηκτώματος ηλεκτροφόρησης μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF και στη συνέχεια επωάζονται με δύο διαφορετικά αντισώματα, εκ των οποίων το πρώτο αλληλεπιδρά εκλεκτικά με την προς ανίχνευση πρωτεΐνη, ενώ το δεύτερο συνδέεται ισχυρά με τη σταθερή μη μεταβλητή (Fc) περιοχή του πρώτου. Η ανίχνευση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης στη μεμβράνη PVDF επιτυγχάνεται με την προσθήκη άχρωμου υποστρώματος στο διάλυμα επώασης και με τη τελική του μετατροπή σε έγχρωμο εύκολα ανιχνεύσιμο προϊόν, αντίδραση που πραγματοποιείται από το ενεργό ένζυμο, που είναι μόνιμα συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα («Βιολογία κυττάρου», Μαργαρίτης 2004).

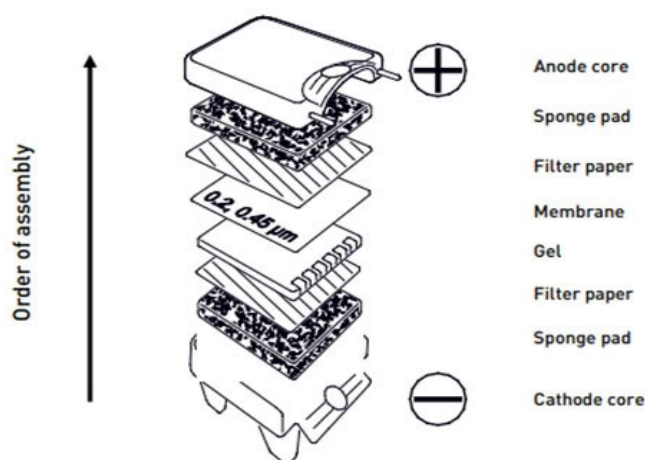
Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση αναπτύχθηκε από την Laemmli (Laemmli, 1970). Το πήκτωμα διαχωρισμού (πίνακας 1) πολυμερίζεται μέσα σε γυάλινη μήτρα (συσκευή ηλεκτροφόρησης mini protein Bio-Rad). Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού τοποθετείται το πήκτωμα συμπίεσης 5% (πίνακας 1) και η ελαστική μήτρα για τη διαμόρφωση των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων. Τα δείγματα πριν τοποθετηθούν στις υποδοχές του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης είχαν αποδιαταχθεί για 10 λεπτά στους 100°C, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Διαχωρισμού	10%	Συμπίεσης	
H ₂ O	7,9 ml	H ₂ O	4,1 ml
30% Ακρυλαμίδη	6,7 ml	30% Ακρυλαμίδη	1 ml
1,5M Tris pH 8.8	5 ml	0,5M Tris pH 6.8	0,75 ml
10% SDS	0,2 ml	10% SDS	60 μl
10% APS	0,2 ml	10% APS	60 μl
TEMED	15 μl	TEMED	15 μl

Πίνακας 1: Αποτύπωση των ποσοτήτων για την παρασκευή 10% γέλης ακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης 100 V, μέχρι τα δείγματα να περάσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 120 V. Το διάλυμα μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση αποτελείται από 10 ml 10% SDS, 100 ml 10x Tris-Glycine σε 890 ml ddH₂O.

Για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF χρησιμοποιήθηκε η συσκευή XCell II Blot Module. Η πορεία έχει περιγραφεί από τον Towbin (Towbin et al, 1929). Με το διάλυμα μεταφοράς (3 g Tris, 14.4 g γλυκίνη και 20% μεθανόλη) διαβρέχονται 2 χαρτιά Whatman 3MM, 4 σπόγγι και η μεμβράνη PVDF κομμένη στις διαστάσεις του πηκτώματος, όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς και ακολουθεί επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης 300mA για 90 λεπτά στον πάγο.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της τοποθέτησης της γέλης και της μεμβράνης PVDF κατά τη διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς.

Έπειτα ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T (900 ml H₂O, 1 ml Tween, 100 ml 10x TBS) για 10 λεπτά σε κίνηση. Για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων η μεμβράνη επωάζεται για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με παρεμποδιστικό ρυθμιστικό διάλυμα (2,5 g BSA σε 50 ml TBS-T). Ακολουθεί επώαση με το πρώτο αντίσωμα κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C σε κίνηση, αραιωμένο σε TBS-T. Την επόμενη μέρα μετά από δύο πλύσεις με TBS-T, η μεμβράνη επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα (ειδικό για το πρώτο) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Μετά το δεύτερο αντίσωμα επαναλαμβάνονται οι πλύσεις με TBS-T. Η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα ECL (ECL. Thermo Scientific) και ακολουθεί έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (Fuji Film, Fuji medical X-Ray film) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου- αντισώματος πραγματοποιείται με τη χρήση δεύτερου αντισώματος (anti-IgG) στο οποίο έχει προσδεθεί ειδικό μόριο ανίχνευσης, η υπεροξειδάση HRP. Αντισώματα (anti-IgG) σημασμένα με υπεροξειδάση ανιχνεύονται εύκολα με μεθόδους χημειοφωταύγειας.

Η μέθοδος ECL βασίζεται στην εκπομπή φωτός από μια ουσία όπως η luminal (κυκλικός διακυδραζίτης), όταν φτάνει σε κατάσταση διέγερσης (οξειδωμένη μορφή).

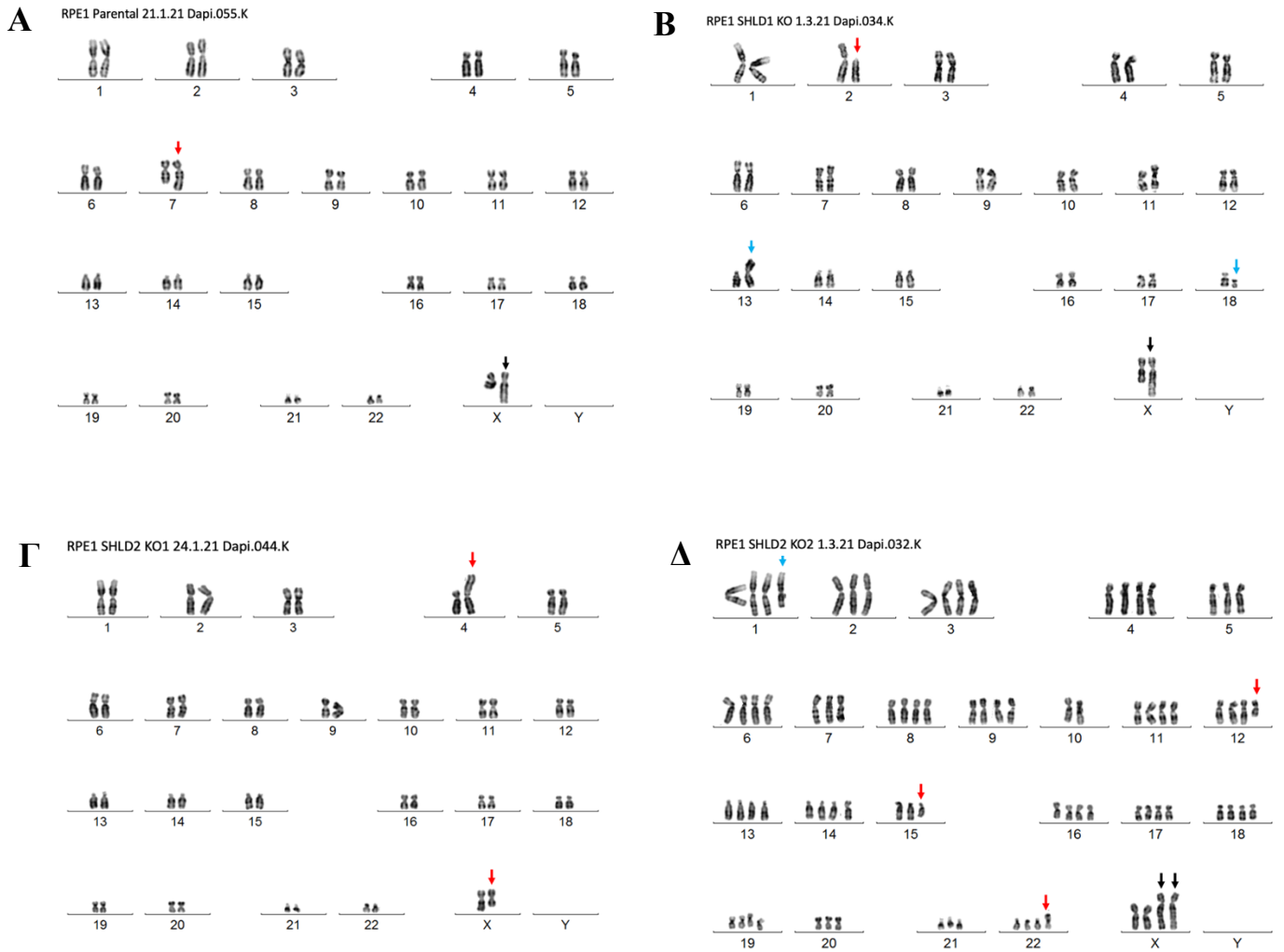
Ενίσχυση της χημειοφωταύγειας επιτυγχάνεται όταν η οξείδωση της luminal από την υπεροξειδάση πραγματοποιείται παρουσία ενός χημικού ενισχυτή όπως είναι οι φαινόλες. Η μέγιστη εκπομπή φωτός είναι στα 428nm και μπορεί να ανιχνευτεί με μια σύντομη έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Γ. Αποτελέσματα

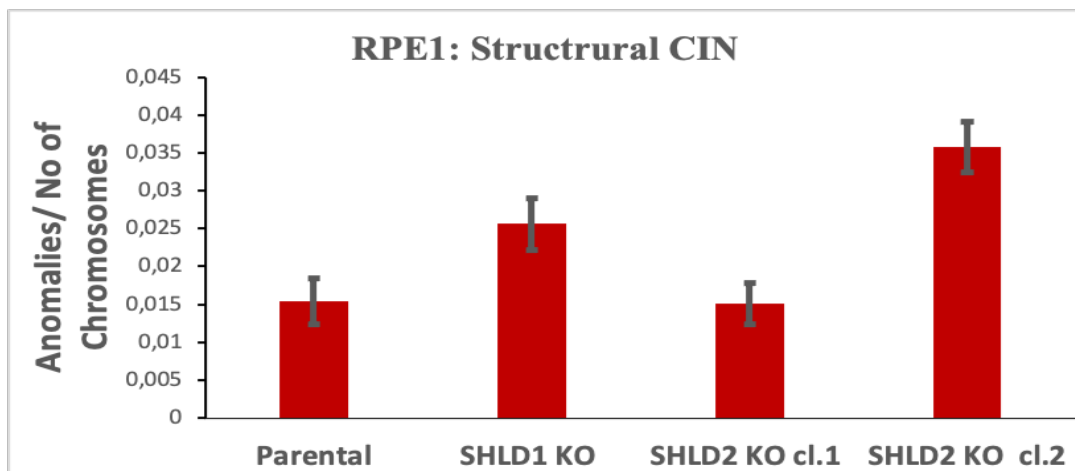
1. Διερεύνηση του ρόλου του συμπλόκου της Shieldin στη χρωμοσωμική αστάθεια

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το σύμπλοκο Shieldin φαίνεται να σχετίζεται με την προστασία των άκρων του DNA και τη μη ομόλογη σύζευξη (Setiawan & Durocher, 2019). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά ακόμα για την ακριβή λειτουργία του. Για τη διερεύνηση του ρόλου του, στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς (human retinal pigment epithelial-1, RPE-1 cell line) τα οποία ύστερα από την επεξεργασία τους με τεχνικές CRISPR Cas9, δεν εκφράζουν κάποια από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελείται από αθανатоποιημένα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα αμφιβληστροειδούς, στα οποία έχει ενεργοποιηθεί η τελομεράση. Τα κύτταρα αυτά προτιμώνται σε σχέση με καρκινικές σειρές, καθώς έτσι μπορεί εύκολα να μελετηθεί ένας συγκεκριμένος παράγοντας, χωρίς να επηρεάζεται από την πολυπλοκότητα και την ποικιλομορφία που έχουν τα καρκινικά κύτταρα.

Πιο συγκεκριμένα, για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα RPE1 που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SHLD1 (SHLD1 knockout- SHLD1 KO), δύο κλώνοι κυττάρων που δεν εκφράζουν την SHLD2 (SHLD2 KO cl.1 και SHLD2 KO cl.2), αλλά και κύτταρα που εκφράζουν κανονικά τις πρωτεΐνες του συμπλόκου της Shieldin (Parental), τα οποία χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Για τη μελέτη χρωμοσωμικών ανακατατάξεων πραγματοποιήθηκε καρυοτυπική ανάλυση, 50 μιτωτικών κυττάρων από κάθε κατάσταση και ποσοτικοποίηση των τυχαίων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων και κλωνικών παρεκκλίσεων. Παρακάτω απεικονίζεται ενδεικτικά ένας καρυότυπος από κάθε κατάσταση. Με κόκκινα βέλη έχουν σημειωθεί οι τυχαίες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, με μπλε οι νέες κλωνικές παρεκκλίσεις και με μαύρο μόνιμες κλωνικές παρεκκλίσεις.



Εικόνα 10: Χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Ενδεικτικοί καρνότυποι, (A) RPE1 Parental, (B) RPE1 SHLD1 KO, (Γ) RPE1 SHLD2 KO cl.1, (Δ) RPE1 SHLD2 KO cl.2. Τα κόκκινα βέλη αντιστοιχούν στις τυχαίες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, τα μπλε στις νέες κλωνικές παρεκκλίσεις και τα μαύρα στις μόνιμες κλωνικές παρεκκλίσεις



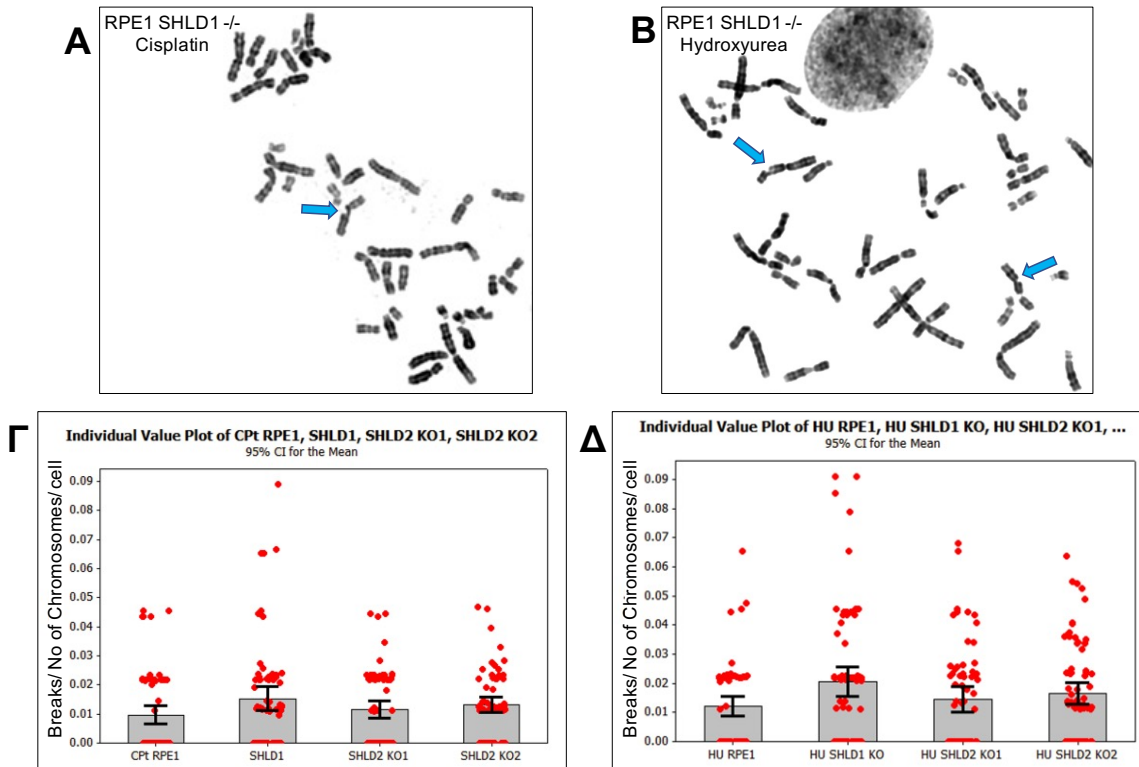
Εικόνα 11: Δομική χρωμοσωμική αστάθεια (CIN). Διαγραμματική απεικόνιση των τυχαίων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων σε σχέση με τον αριθμό των χρωμοσωμάτων σε κάθε μιτωτικό κύτταρο, για κάθε ένα από τους τέσσερις κλώνους RPE1 κυττάρων.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα τα κύτταρα που δεν εκφράζουν την SHLD1 εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη συχνότητα τυχαίων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων, ενώ τα ποσοστά εμφάνισης τυχαίας τετραπλοϊδίας αυξήθηκαν επίσης σημαντικά στα κύτταρα αυτά. Ωστόσο, τα ποσοστά δομικής χρωμοσωμικής αστάθειας ήταν ασύμφωνα μεταξύ των δύο κλώνων των κυττάρων που δεν εκφράζουν SHLD2. Ο κλώνος 1 δεν εμφανίζει διαφορές με τα Parental κύτταρα, όσο για τη δομική CIN, όσο και για την τετραπλοϊδία. Από την άλλη ο κλώνος 2 εμφανίζει σημαντικά αυξημένη συχνότητα τυχαίων δομικών χρωμοσωμικών ατακατατάξεων. Η χρωμοσωμική ανάλυση έδειξε ότι τα κύτταρα του κλώνου 2 της SHLD2 knockout είναι 100% τετραπλοϊδικά, ενώ του κλώνου 1 είναι κυρίως διπλοϊδικά.

Επιπλέον, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της τελομεράσης, τα RPE1 +hTERT κύτταρα εμφανίζουν καρυοτυπικά χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης, όπως είναι οι συχνές τελομερικές χρωμοσωμικές συντήξεις (end-to-end chromosome fusions) και η αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς τετραπλοϊδίας.

1.1 Επίδραση γονοτοξικών παραγόντων σε κύτταρα που δεν εκφράζουν κάποια από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου Shieldin

Στη συνέχεια για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου του συμπλόκου της Shieldin μελετήθηκε η απόκριση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε γονοτοξικούς παράγοντες, όπως είναι η σισπλατίνη και η υδροξουρία. Για τον σκοπό αυτό οι τέσσερις αυτοί κλώνοι κυττάρων εκτέθηκαν σε σισπλατίνη (10 μ M για 16 ώρες) ή υδροξουρία (4 mM για 5 ώρες), κατά την καλλιέργειά τους. Μετά την παραλαβή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και τη χρώση αυτών με Dapi, εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι χρωμοσωμικές θραύσεις σε 75 μιτωτικά κύτταρα για κάθε περίπτωση, από τρία ανεξάρτητα πειράματα κάθε φορά.



Εικόνα 12: Μετά την επίδραση με σισπλατίνη ή υδροξυουρία οι χρωμοσωμικές θραύσεις αυξάνονται σε κύτταρα RPE1 που δεν εκφράζουν την SHLD1 πρωτεΐνη. Α. Απεικόνιση θραύσεων μετά την επίδραση με σισπλατίνη (μπλε βέλος). Β. Απεικόνιση θραύσεων με την επίδραση με υδροξυουρία (μπλε βέλη). Γ,Δ. Διαγραμματική απεικόνιση των χρωμοσωμικών θραύσεων ύστερα από επιδράσεις με σισπλατίνη ή υδροξυουρία σε RPE1 κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν κάποια από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου Shieldin, SHLD1 KO, SHLD2 KO cl.1, SHLD2 KO cl.2 και control κύτταρα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την επίδραση με υδροξυουρία ή σισπλατίνη εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στα κύτταρα που δεν εκφράζουν SHLD1, αλλά όχι σε αυτά που δεν εκφράζουν την SHLD2. Όπως τα αποτελέσματα της χρωμοσωμικής αστάθειας, τα ποσοστά χρωμοσωμικών θραυσμάτων ήταν ασύμφωνα μεταξύ των δύο κλώνων των κυττάρων που δεν εκφράζουν SHLD2. Ο κλώνος 1 μετά την επίδραση με υδροξυουρία ή σισπλατίνη δεν εμφανίζει διαφορές με control κύτταρα τα οποία εκφράζουν κανονικά τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, ενώ ο κλώνος 2 εμφανίζει σημαντικά αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμικών θραύσεων.

2. Το ανεξάρτητο από RAD52 μονοπάτι του ALT μηχανισμού αντιστοιχεί σε εσωχρωμοσωμικό συντηρητικό τρόπο αντιγραφής των τελομερών

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διπλωματικής στόχος ήταν η μελέτη του εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών και η σχέση του με τον μηχανισμό BIR. Ο ALT μηχανισμός έχει δείχθει ότι βασίζεται στον BIR, ένα παράπλευρο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, καταφέροντας να νεοσυνθέσει μεγάλα τμήματα DNA με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής.

2.1 Απώλεια της έκφρασης της EXD2 αυξάνει τα επίπεδα εξαρτώμενης από BIR εσωχρωμοσωμικής συντηρητικής αντιγραφής στα τελομερή

Ένας μηχανισμός BIR είναι αυτός που μπορεί, μέσα στο ίδιο το χρωμόσωμα, να επιμηκύνει το τελομερές όταν υπάρχει ένα κολαπάρισμα του βρόγχου της αντιγραφής.

Αν για παράδειγμα, ένα τελομερές αντιμετωπίσει ένα πρόβλημα κατά την αντιγραφή, μπορεί εύκολα να προκύψει αναστροφή του βρόγχου της αντιγραφής και δημιουργία μίας δομής που μοιάζει με τρίαίνα, η οποία είναι τοξική για το DNA. Αυτή η δομή κινητοποιεί ρεζολβάσες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αποδομήσουν αυτή τη δομή, ενώ παράλληλα με την αποδόμηση γίνεται και η κατάρρευση του βρόγχου της αντιγραφής. Μία από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία είναι και η πρόσφατα ανακαλυφθείσα EXD2. Η σχέση της EXD2 με τη φουρκέτα της αντιγραφής και την επιδιόρθωση διπλών θραύσεων μέσω ομολογίας, μας έκανε να σκεφτούμε ότι πιθανόν, η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται και με τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών.

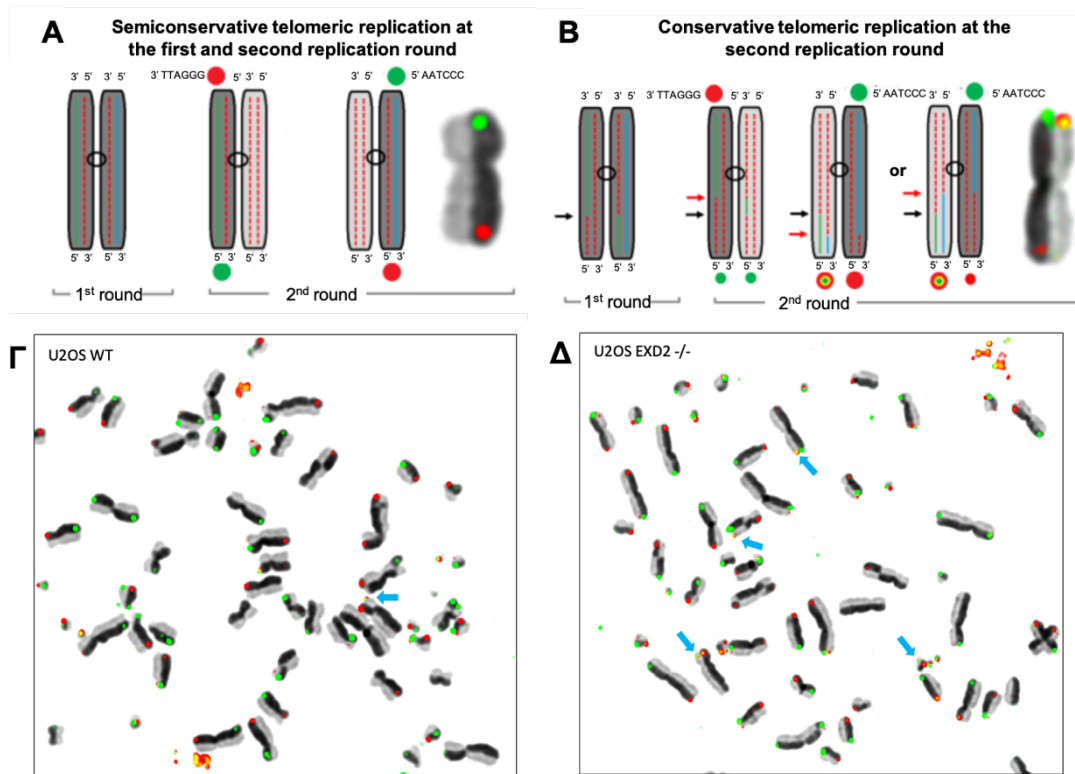
Η EXD2 (Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2), όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μία πρωτεΐνη με ενεργότητα εξωνουκλεάσης 3'-5', οποία συμμετέχει και αυτή στον μηχανισμό BIR, αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό (HR). Βασικός της ρόλος είναι η αποδόμηση της φουρκέτας αντιγραφής όταν έχει γίνει αναστροφή του βρόγχου αντιγραφής, με σκοπό την επανεκκίνηση του βρόγχου και την αποφυγή της γονιδιωματικής αστάθειας.

Για την περαιτέρω μελέτη της λειτουργίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αλλά και την εξακρίβωση της σχέσης της με τον μηχανισμό BIR, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα οστεοσαρκώματος (U2OS), τα οποία μετά την επεξεργασία τους με τεχνικές CRISPR Cas9 δεν εκφράζουν την EXD2. Γνωρίζοντας ότι ένα μεγάλο ποσοστό του BIR μηχανισμού είναι συντηρητικός, θελήσαμε να δούμε τι συμβαίνει με την έλλειψη της EXD2. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μία νέα τεχνολογία, η οποία αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας και είναι ικανή να ξεχωρίσει, εκτός τον ομόλογο ανασυνδυασμό στα τελομερή και φαινόμενα που αφορούν τον BIR. Η μέθοδος αυτή μπορεί με πολύ μεγάλη ευαισθησία να εντοπίσει σημεία στα οποία έχει συμβεί επιμήκυνση των τελομερών με εσωχρωμοσωμικό συντηρητικό τρόπο αντιγραφής, αλλά μπορεί επίσης να εντοπίσει ανταλλαγές αδερφών χρωματίδων στα τελομερή των χρωμοσωμάτων (TSCEs).

Προκειμένου να καταστεί σαφής ο διαχωρισμός μεταξύ συντηρητικού και μη τρόπου αντιγραφής σε τελομερή ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, η μέθοδος βασίστηκε στο γεγονός ότι οι δύο τελομερικές DNA αλυσίδες μπορούν να διακριθούν χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές αναγνώρισης κλώνων πλούσιων σε G και C αντίστοιχα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε κόκκινος τελομερικός ανιχνευτής για την ανίχνευση του πλούσιου σε γουανίνη τελομερικού άκρου (G-rich) και πράσινος για την ανίχνευση του πλούσιου σε κυτοσίνη τελομερικού άκρου (C-rich).

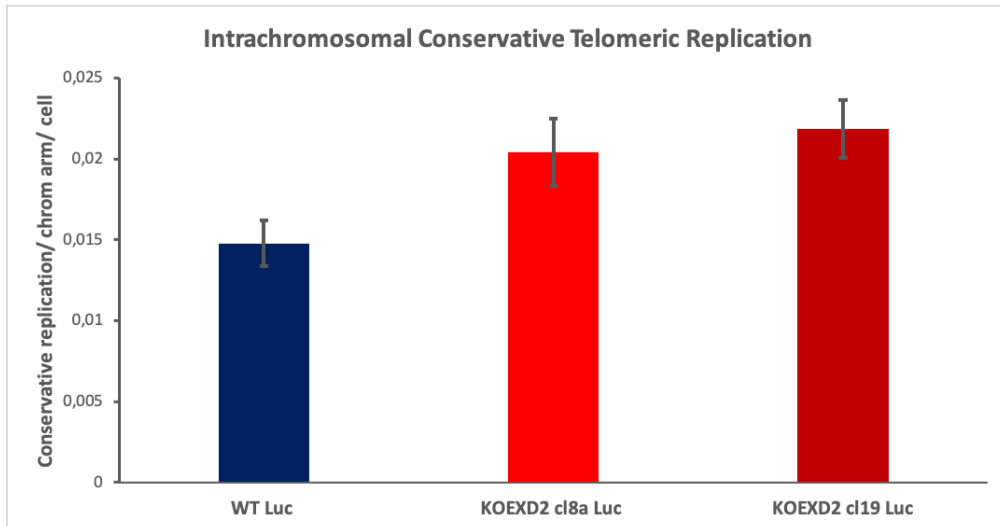
Ανθρώπινα, καρκινικά κύτταρα U2OS καλλιεργήθηκαν παρουσία αντιδραστηρίων βρώμο-2-δεοξουριδίνης (BrdU) και βρώμο-2-δεοξυκυτοσίνης (BrdC), τα οποία αποτελούν ανάλογα της θυμιδίνης, για δύο κύκλους αντιγραφής. Στη συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός του χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού με φθορίζοντα in-situ υβριδισμό (CO-FISH), δύο χρωμάτων, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Το BrdU/C ενσωματώνεται στους νεοσυντιθέμενους κλώνους DNA και μετά την επεξεργασία με Hoechst/UV και εξωνουκλεάση III αυτοί αφαιρούνται, ώστε να ανιχνεύονται μόνο οι πατρικοί κλώνοι DNA. Η ανίχνευση γίνεται με χρώση με μη αποδιατακτικό κλωνο-ειδικό PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Analog FISH) και τα

διαφορετικά επισημασμένα χρωμοσώματα γίνονται ορατά χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού. Μέσω αυτού του τροποποιημένου CO-FISH μπορεί με ακρίβεια να ανιχνευτεί η μεσολαβούμενη από BIR ενδοχρωμοσωμική συντηρητική αντιγραφή των τελομερών, καθώς τα συνεντοπιζόμενα G-rich και C-rich τελομερικά σήματα στην άκρη του χρωμοσώματος υποδεικνύουν συντηρητική DNA σύνθεση μέσω του μηχανισμού τον BIR.



Εικόνα 13: Ανίχνευση συντηρητικής εσωχρωμοσωμικής αντιγραφής στα τελομερή. Α. Σχηματική απεικόνιση του ημισυντηρητικού τρόπου αντιγραφής των τελομερών μετά από δύο κύκλους αντιγραφής. Β. Σχηματική απεικόνιση συντηρητικού τρόπου αντιγραφής τελομερών μετά από δύο κύκλους αντιγραφής. Γ,Δ. Τα μπλε βέλη δείχνουν σημεία στα οποία έχει συμβεί επιμήκυνση τελομερών με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής σε κύτταρα U2OS WT και σε κύτταρα U2OS EXD2 knockout.

Θέλοντας να διαπιστωθεί ο ρόλος της EXD2 στα φαινόμενα ενδοχρωμοσωμικού BIR, κύτταρα knockout για την EXD2 συγκρίθηκαν με WT κύτταρα. Στο σύνολο εξετάστηκαν 75 μεταφάσεις για κάθε περίπτωση (25 μεταφάσεις ανά πείραμα, το οποίο επαναλήφθηκε τρεις φορές). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα του εσωχρωμοσωμικού συντηρητικού αντιγραφικού τρόπου επιμήκυνσης των τελομερών αυξάνονται σημαντικά όταν υπάρχει έλλειψη την πρωτεΐνης EXD2.



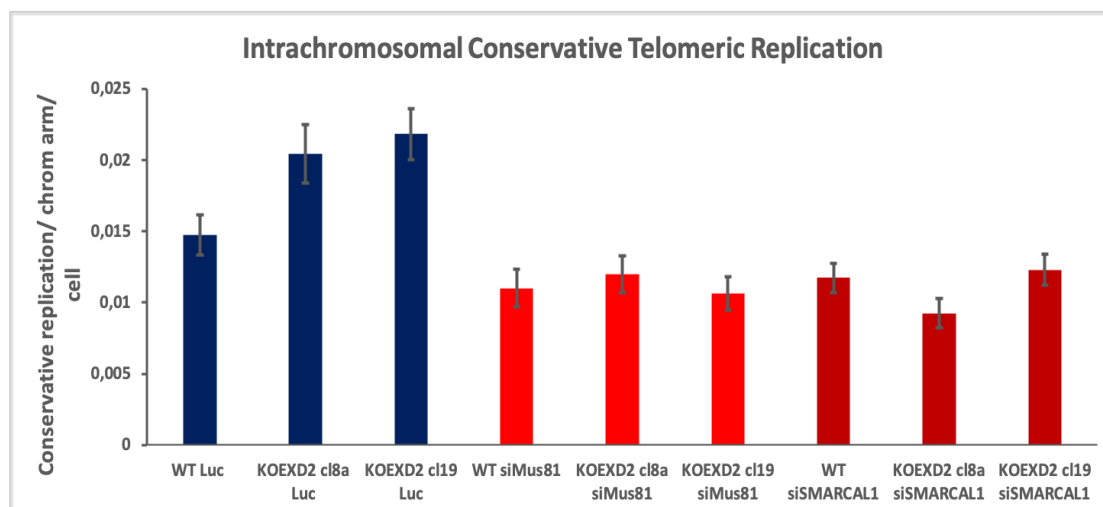
Εικόνα 14: Τα επίπεδα συντηρητικής αντιγραφής των τελομερών αυξάνονται σε κύτταρα U2OS EXD2 knockout

2.1.1 Απώλεια έκφρασης των *Mus81* και *SMARCAL1* σε κύτταρα που δεν εκφράζουν *EXD2* οδηγεί σε καταστολή της εξαρτώμενης από *BIR* συντηρητικής εσωχρωμοσωμικής αντιγραφής στα τελομερή

Έπειτα, με την τεχνική του siRNA αποσιωπήθηκε η έκφραση και άλλων δύο πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μονοπάτι αυτό, της *SMARCAL1* και της *Mus81*, σε κύτταρα U2OS που δεν εκφράζουν *EXD2*. Είναι γνωστό ότι η *SMARCAL1* είναι μία πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στην απόκριση του στρες της αντιγραφής, συμμετέχοντας στην επανεκκίνηση των σταματημένων διχάλων αντιγραφής και επιτρέποντας την σωστή εξέλιξή τους. Έχει ενεργότητα ελικάσης και ATPάσης και ξετυλίγει το DNA μαζί με το σύμπλοκο RPA, μεσολαβώντας στην παλινδρόμηση των ακινητοποιημένων πιρουνίων (Holliday junction). Γνωρίζοντας ότι η *EXD2* δρα κατασταλτικά για το μονοπάτι *BIR* το οποίο είναι ανεξάρτητο από την *RAD52* ελέγχθηκε αν η παλινδρόμηση της διχάλας αντιγραφής, η οποία προκύπτει κατά την έλλειψη της *EXD2*, διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην έναρξη του ανεξάρτητου από τη *RAD52* μονοπατιού *BIR*. Ελέγχθηκε λοιπόν, εάν η έλλειψη τόσο της *EXD2* όσο και της *SMARCAL1* οδηγεί σε εξαρτώμενη από *BIR* συντηρητική εσωχρωμοσωμική αντιγραφή στα τελομερή.

Από την άλλη, η πρωτεΐνη *Mus81* είναι μία ενδοουκλεάση, η οποία συμμετέχει στη διάσπαση των σταματημένων διχάλων αντιγραφής αλληλεπιδρώντας με την *SLX4*, οδηγώντας στην κατάρρευση της δομής. Τέθηκε λοιπόν το ερώτημα, αν κατά την έλλειψη της *EXD2* οι παλινδρομες δομές που σχηματίζονται, πιθανώς με την βοήθεια της *SMARCAL1*, επεξεργάζονται έπειτα από την *Mus81* με σκοπό τη σύνθεση DNA και την εκκίνηση της σταματημένης διχάλας της αντιγραφής. Για την απάντηση σε αυτό το ερώτημα πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενδοχρωμοσωμικής σύνθεσης DNA σε κύτταρα U2OS που δεν εκφράζουν *EXD2*, ενώ παράλληλα έχει αποσιωπηθεί η εξωνουκλεάση *Mus81*.

Ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο, εξετάστηκαν 75 μεταφάσεις για κάθε περίπτωση (25 μεταφάσεις ανά πείραμα, το οποίο επαναλήφθηκε τρεις φορές).



Εικόνα 15: Απόλεια έκφρασης των *Mus81* και *SMARCAL1* σε κύτταρα U2OS EXD2 knockout καταστέλλει τη συντηρητική αντιγραφή στα τελομερή.

Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης *Mus81* στους κλώνους που δεν εκφράζουν την *EXD2* φαίνεται να καταστέλλει τη συντηρητική αντιγραφή στα τελομερή, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και με την αποσιώπηση της *SMARCAL1*.

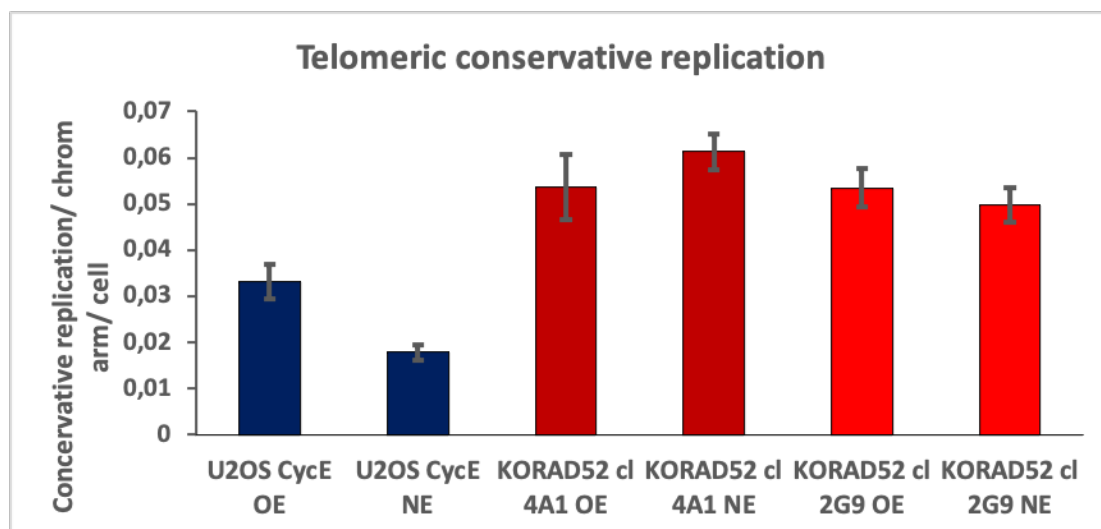
2.2 Απόλεια της έκφρασης της *RAD52* αυξάνει τα επίπεδα εξαρτώμενης από BIR εσωχρωμοσωμικής συντηρητικής αντιγραφής στα τελομερή

Στη συνέχεια, με τη χρήση της ίδιας τεχνολογίας εξετάστηκαν τα επίπεδα εσωχρωμοσωμικού συντηρητικού αντιγραφικού τρόπου επιμήκυνσης των τελομερών και σε κύτταρα U2OS, τα οποία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη *RAD52* (*RAD52* knockout- *RAD52* KO). Όπως έχει ήδη αναφερθεί στους ανθρώπινους καρκίνους, η οδός ALT μπορεί να μεσολαβείται από δύο ή περισσότερους διαφορετικούς μηχανισμούς, ένας από τους οποίους είναι ανεξάρτητος της ρεκομπινάσης *RAD52*. Το μονοπάτι αυτό εξαρτάται από τις πρωτεΐνες *BLM*, *POLD3* και *POLD4*, υποδηλώνοντας τη συσχέτισή του με τον BIR.

Τα κύτταρα που εξετάστηκαν στα πειράματα αυτά έφεραν ένα σύστημα ελέγχου της έκφρασης της κυκλίνης E, το οποίο εξαρτάται από το αντιβιοτικό δοξυκυκλίνη. Συνεπώς, παρουσία δοξυκυκλίνης, η έκφραση της κυκλίνης E ήταν φυσιολογική, ενώ απουσία δοξυκυκλίνης το γονίδιο της κυκλίνης E υπερεκφραζόταν. Η υπερέκφραση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή αντιγραφικού στρες στο κύτταρο (Bartkova et al., 2005, Costantino et al., 2014). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το αντιγραφικό στρες οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση της διχάλας αντιγραφής, η οποία επιδιορθώνεται μέσω του μηχανισμού BIR. Επομένως, υπερεκφράζοντας την κυκλίνη E, οι βλάβες στη διχάλα αντιγραφής αυξάνονται, άρα θα ήταν αναμενόμενη η αύξηση του φαινοτύπου BIR, όπως και του συντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής.

Συνολικά εξετάστηκαν μεταφάσεις κυττάρων U2OS *RAD52* KO, τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα κυκλίνης E (normal expression, NE), καθώς και κύτταρα που υπερεκφράζουν την κυκλίνη E (over expression, OE). Συγκεκριμένα μελετήθηκαν δύο κλώνοι των κυττάρων αυτών, ο κλώνος 4A1 και ο κλώνος 2G9, καθώς και τα κύτταρα U2OS CysE τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά την *RAD52*, αποτελώντας μάρτυρα για

τα πειράματα. Για κάθε περίπτωση εξετάστηκαν 75 μεταφάσεις (25 μεταφάσεις ανά πείραμα, το οποίο επαναλήφθηκε τρεις φορές).



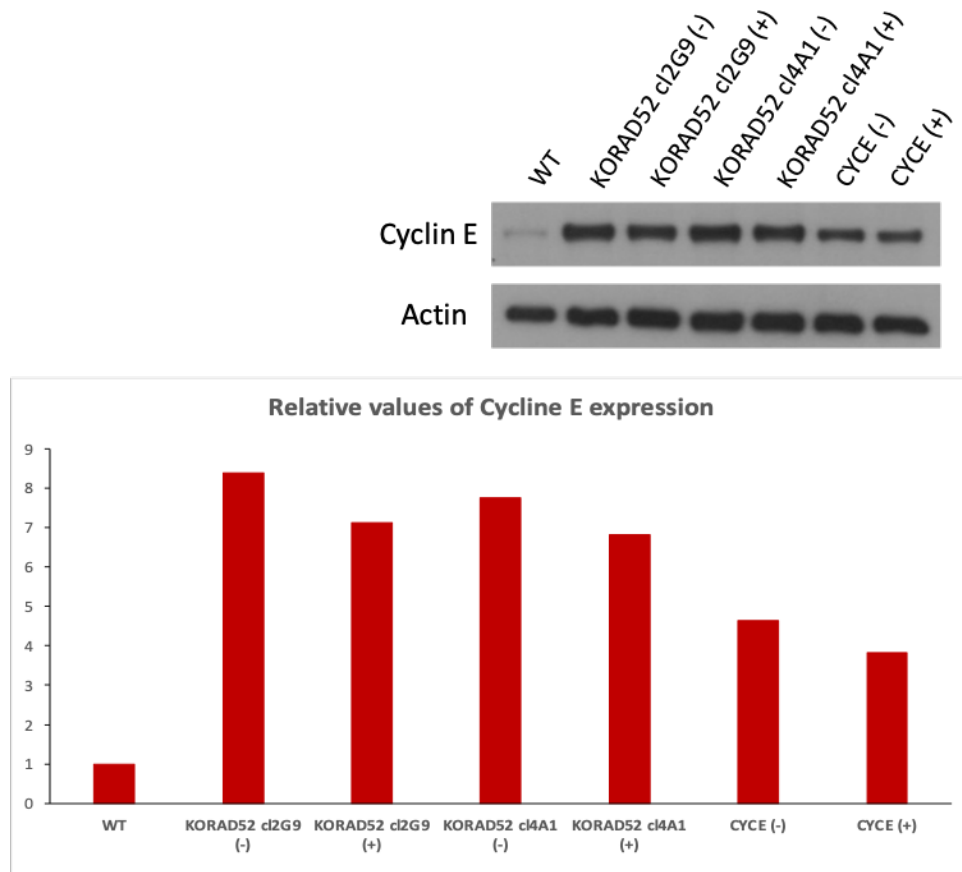
Εικόνα 16: Τα επίπεδα συντηρητικής αντιγραφής των τελομερών αυξάνονται σε κύτταρα U2OS RAD52 knockout, που υπερεκφράζουν (OE) ή όχι (NE) την κυκλίνη E.

Η έλλειψη της έκφρασης της ρεκομπινάσης RAD52 φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του εσωχρωμοσωμικού BIR, τόσο υπό κανονικές συνθήκες κυτταρικής λειτουργίας όσο και σε συνθήκες στρες αντιγραφής, έπειτα από την υπερέκφραση της κυκλίνης E.

Ωστόσο, τα επίπεδα συντηρητικής αντιγραφής των τελομερών σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την κυκλίνη E σε σχέση με κύτταρα με φυσιολογική έκφραση δεν φαίνεται να ακολουθούν ένα σταθερό μοτίβο σε όλους τους κλώνους των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα CycE OE εμφανίζουν αύξηση του φαινοτύπου BIR σε σχέση με τα CycE NE, ενώ τα KORAD52 cl4A1 OE εμφανίζουν μείωση σε σχέση με τα KORAD52 cl4A1 NE. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία πιθανή αδυναμία ελέγχου του συστήματος έκφρασης της κυκλίνης E από τη δοξυκυκλίνη.

2.2.1 Έλεγχος συστήματος υπερέκφρασης κυκλίνης E

Για να διαπιστώσουμε ότι όντως υπάρχει διαφορά στην έκφραση της κυκλίνης E μετά την επιμόλυνση με πλασμιδιακό DNA στα κύτταρα U2OS που δεν εκφράζουν RAD52 ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Western blotting, με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της κυκλίνης E. Με τη χρήση της τεχνικής αυτής καθίσταται ικανή η ανίχνευση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μετά την ηλεκτροφόρηση του συνόλου των πρωτεϊνών του δείγματος και τη μεταφορά αυτών σε υλικό στήριξης, με τη χρήση ειδικού για την πρωτεΐνη αντισώματος. Οι σχετικές τιμές της έκφρασης της κυκλίνης προσδιορίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα ImageJ.



Εικόνα 17: Υπερέκφραση κυκλίνης E απουσία δοξυκυκλίνης. Πείραμα ανοσοσύτωσης κατά Western σε κύτταρα KO RAD52 έδειξε ότι η απουσία δοξυκυκλίνης (-) οδηγεί σε σχετική υπερέκφραση της κυκλίνης E, σε σχέση με παρουσία αυτής (+).

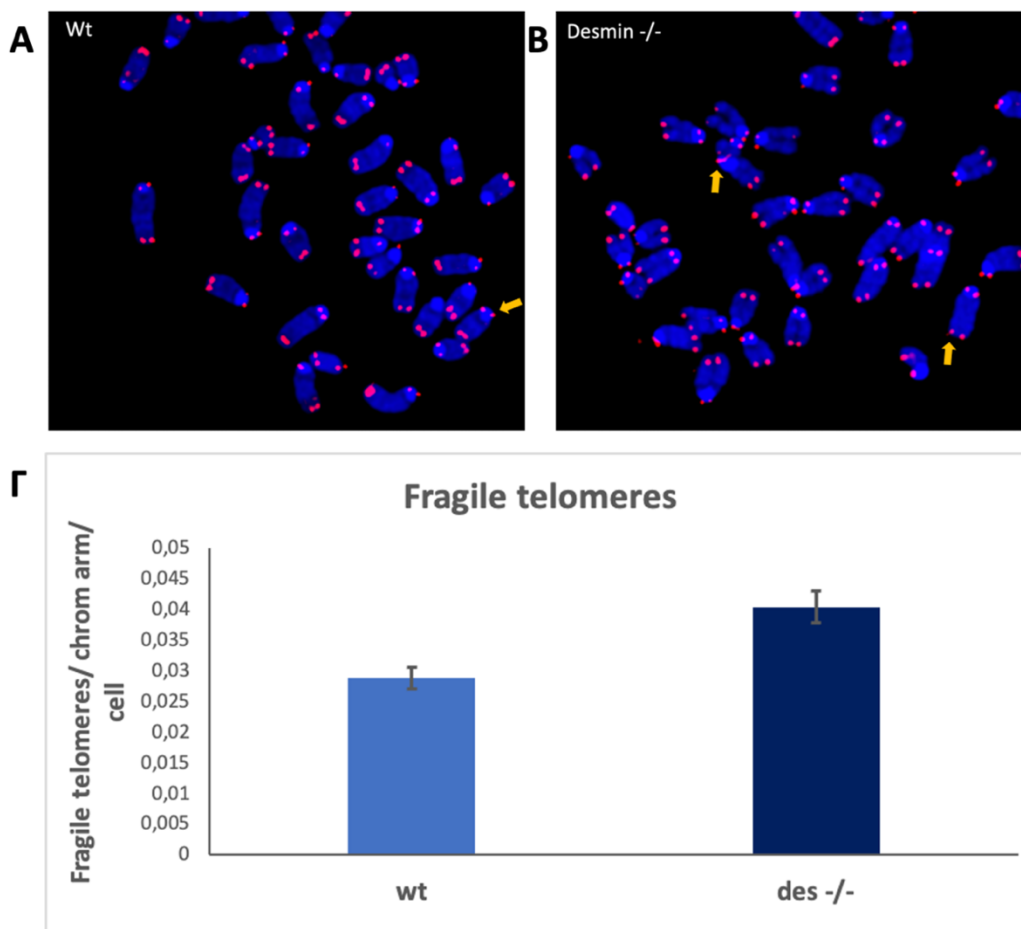
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα υπάρχει μία μικρή διαφορά στην έκφραση της κυκλίνης E παρουσία ή απουσία δοξυκυκλίνης κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, αλλά όχι τόσο σημαντική. Πράγματι, τα κύτταρα που καλλιεργούνται απουσία δοξυκυκλίνης εκφράζουν υψηλότερα ποσοστά κυκλίνης E, με τη διαφορά αυτή να είναι πιο αισθητή στους κλώνους 2G9 και 4A1 των κυττάρων RAD52 knockout κυττάρων και όχι τόσο στα CyCE κύτταρα. Επιπλέον, το γεγονός ότι όλα τα δείγματα έχουν υψηλότερα ποσοστά έκφρασης της κυκλίνης E από τα wild type (WT) κύτταρα, επιβεβαιώνει ότι το σύστημα αυτό δεν είναι τόσο αξιόπιστο. Η αδυναμία επαρκούς ελέγχου του συστήματος από τη δοξυκυκλίνη πιθανόν να οφείλεται και στην ηλικία των κυττάρων αυτών. Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τις ενδείξεις του προηγούμενου πειράματος για διαρροές του συστήματος ελέγχου της έκφρασης της κυκλίνης E.

3. Τα επίπεδα των εύθραυστων τελομερών αυξάνονται σε βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού που δεν εκφράζουν δεσμίνη.

Η Δεσμίνη είναι μία μυοειδική πρωτεΐνη, απαραίτητη για τη σωστή μυϊκή δομή και λειτουργία, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη μυογένεση. Μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία, αλλά και ιστολογική ανάλυση έχουν δείξει ότι απουσία της δεσμίνης, τόσο η καρδιά όσο και ο σκελετικός μυς υφίσταται έντονη αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής του μύος και εκφυλισμό. Οι δομικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν

απώλεια της αγκυροβόλησης της μυϊκής ίνας στο σαρκείλημα, διαταραχή της πλευρικής στοίχισης των μυϊκών ινών, διαταραχή της οργάνωσης και του αριθμού των μιτοχονδρίων και αλλαγή της θέσης και του σχήματος του πυρήνα. (Milner et al., 1996; Caretanaki et al., 1997; Thornell et al., 1997). Επιπλέον, εμβρυικά βλαστικά κύτταρα από ποντίκια που τους λείπει η δεσμίνη δείχνουν ότι υπάρχει ανώμαλη έκφραση μυοειδικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μυογενών μεταγραφικών παραγόντων myoD και μυογενίνη, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η δεσμίνη συνδέεται με τις πυρηνικές λειτουργίες.

Για τη μελέτη της επίδρασης της δεσμίνης στη δημιουργία εύθραυστων τελομερών μελετήθηκαν CSP κύτταρα ποντικού τα οποία δεν εκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τα CSP (Cardiac side population) είναι καρδιακά βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται στην καρδιά και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ινοβλάστες. Συνολικά εξετάστηκαν 50 μεταφάσεις βλαστοκυττάρων καρδιάς ποντικού που δεν εκφράζουν δεσμίνη και συγκρίθηκαν με κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής (25 μεταφάσεις ανά πείραμα, το οποίο επαναλήφθηκε δύο φορές). Τα εύθραυστα τελομερή ανιχνεύτηκαν ύστερα από χρώση τους με την τεχνική PNA FISH και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 18: Τα επίπεδα εύθραυστων τελομερών αυξάνονται σε κύτταρα που δεν εκφράζουν δεσμίνη. A,B. Απεικόνιση εύθραυστων τελομερών σε βλαστοκύτταρα ποντικού που δεν εκφράζουν δεσμίνη και σε WT κύτταρα (πορτοκαλί βέλη).

Η έλλειψη της έκφρασης δεσμίνης φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα εύθραυστων τελομερών σε βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού.

Δ. Συζήτηση

Τα τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων και οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι περιοχές του γονιδιώματος υπερευαίσθητες στο στρες αντιγραφής του DNA, ευάλωτες σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και έχουν συνδεθεί τόσο με την εμφάνιση νεοπλασίας όσο και την ανάπτυξη γονιδιωματικής αστάθειας στον καρκίνο. Επιπλέον, άμεσα συνδεδεμένα με την εμφάνιση νεοπλασίας και την ανάπτυξη γονιδιωματικής αστάθειας στον καρκίνο είναι τα θραύσματα δίκλωνου DNA (DSBs). Τα DSBs είναι κυτταροτοξικές βλάβες του DNA που πρέπει να επισκευαστούν αποτελεσματικά και με ακρίβεια για να διατηρηθεί η σταθερότητα του γονιδιώματος και να αποτραπεί η πρόωγη γήρανση, ο νευροεκφυλισμός, η ανοσοανεπάρκεια, ο καρκίνος και άλλες ασθένειες (Goldstein & Kastan, 2015; Jackson & Bartek, 2009; Schwertman et al, 2016).

Οι δύο κύριοι τύποι επιδιόρθωσης DSB είναι η μη ομόλογη ένωση των άκρων (NHEJ) που είναι ενεργή σε όλο τον κυτταρικό κύκλο και ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR), ο οποίος λειτουργεί μόνο στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου. Η επιλογή της οδού επιδιόρθωσης των DSB καθορίζεται εν μέρει από τον λειτουργικό ανταγωνισμό μεταξύ διάφορων παραγόντων, όπως του παράγοντα προαγωγής HR BRCA1 και των πρωτεϊνών που προάγουν τον NHEJ, όπως οι TB53P1 (53BP1), RIF1 και MAD2L2 (REV7). Δύο ακόμη όχι καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες έχει δείχθει ότι συμμετέχουν στην προαγωγή του NHEJ και αυτές είναι οι C20orf196 (SHLD1) και FAM35A (SHLD2), οι οποίες συγκροτούν το σύμπλοκο Shieldin (Boersma et al, 2015; Bunting et al, 2010; Charman et al, 2013). Έχει αποδειχτεί ότι το σύμπλοκο Shieldin δρα ως μεταγενέστερος τελεστής των 53BP1/ RIF1/ MAD2L2 για την προώθηση της τελικής σύνδεσης των DSBs, μέσω περιορισμού της εκτομής DSB και εξουδετέρωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού ανταγωνίζοντας τη φόρτωση BRCA1/ RAD51 σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη BRCA1 (Dev et al, 2018).

Στη συγκεκριμένη εργασία φάνηκε ότι αυξάνεται η χρωμοσωμική αστάθεια σε RPE1 κύτταρα που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SHLD1, όπως και σε έναν από τους δύο κλώνους κυττάρων που δεν εκφράζουν την SHLD2. Επίσης, τα κύτταρα αυτά ήταν πιο ευαίσθητα σε κυτταροτοξικούς παράγοντες όπως η υδροξουρία και η σισπλατίνη, αφού εμφάνισαν αυξημένες χρωμοσωμικές θραύσεις μετά την έκθεσή τους σε αυτές. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της ομάδας του Jackson, που έδειξαν ότι η αδρανοποίηση του συμπλόκου Shieldin σε κύτταρα που δεν εκφράζουν BRCA1 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στη σισπλατίνη (Dev et al, 2018). Ωστόσο για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων κρίνεται απαραίτητη η μελέτη ακόμα τουλάχιστον ενός κλώνου RPE1 κυττάρων που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SHLD1, καθώς και άλλου τύπου κυττάρων που δεν εκφράζουν αυτές τις δύο πρωτεΐνες.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διπλωματικής στόχος ήταν η μελέτη του εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών και η σχέση του με τον μηχανισμό BIR. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι ένα μεγάλο ποσοστό του DNA που επιδιορθώνεται μέσω του μηχανισμού αυτού, επιδιορθώνεται με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής. Η χρήση μίας νέας τεχνολογίας, η οποία ανακαλύφθηκε στο εργαστήριο μας μπορεί με μεγάλη ευαισθησία να εντοπίσει σημεία στα οποία έχει συμβεί επιμήκυνση των τελομερών με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής ενδοχρωμοσωμικά, αλλά και να ανιχνεύσει ανταλλαγές μεταξύ των τελομερών αδελφών χρωματίδων (TSCEs). Χρησιμοποιώντας λοιπόν την τεχνολογία αυτή σε

κύτταρα που δεν εκφράζουν την εξωνουκλεάση EXD2, βρέθηκε ότι η έλλειψη της EXD2 προκαλεί αύξηση των γεγονότων ενδοχρωμοσωμικής συντηρητικής DNA σύνθεσης. Το ίδιο συμβαίνει και σε κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τη ρεκομπινάση RAD52, τόσο σε κανονικές συνθήκες κυτταρικής λειτουργίας τόσο και σε συνθήκες στρες αντιγραφής, έπειτα από την υπερέκφραση της κυκλίνης E. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με επιπρόσθετα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η EXD2 λειτουργεί ως ένας μοριακός διακόπτης μεταξύ των δύο μονοπατιών BIR, με την απώλειά της να ωθεί τα κύτταρα προς τον ανεξάρτητο από την RAD52 BIR μηχανισμό, ο οποίος φαίνεται να λειτουργεί, κυρίως, ενδοχρωμοσωμικά.

Η καταστολή της συντηρητικής αντιγραφής που παρατηρείται με αποσιώπηση της SMARCA1 σε κύτταρα U2OS που δεν εκφράζουν την EXD2 υποδηλώνει ότι η παλινδρόμηση των διχάλων αντιγραφής είναι, πιθανόν, ένα αρχικό συμβάν για τη δράση του μονοπατιού BIR ανεξάρτητου από τη RAD52. Παράλληλα, η μείωση της συχνότητας ενδοχρωμοσωμικής συντηρητικής DNA σύνθεσης που παρατηρείται με αποσιώπηση της Mus81 στα U2OS EXD2^{-/-} κύτταρα μπορεί να υποδηλώνει ότι η εξαρτώμενη από τη Mus81 διάσπαση των ανεστραμμένων διχάλων αντιγραφής απαιτείται για τη δράση του μονοπατιού BIR ανεξάρτητου από τη RAD52.

Ο BIR είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης, ο οποίος συνδέεται με την παραγωγή εύθραυστων τελομερών. Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από διπλά ή εκτεταμένα σήματα τελομερικού φθορισμού *in situ* υβριδισμού (FISH) σε χρωματιδικά άκρα. Στην εργασία αυτή αποδείχτηκε ότι το ποσοστό των εύθραυστων τελομερών αυξήθηκε σε βλαστοκύτταρα καρδιάς ποντικού που δεν εκφράζουν δεσμίνη. Η αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τη λαμίνη β (Kural-Mangit & Dinçer, 2021), μία πυρηνική πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με την δυναμική των τελομερών στον πυρήνα, μας οδηγεί στην υπόθεση, ότι η έλλειψη της δεσμίνης θα μπορούσε να οδηγήσει σε δυσλειτουργία της λαμίνης και ίσως μη σωστή αντιγραφή των τελομερών. Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογήσει τον αυξημένο φαινότυπο εύθραυστων τελομερών σε κύτταρα που δεν εκφράζουν δεσμίνη.

E. Βιβλιογραφία

1. Aguilera A and Gaillard H (2014) “Transcription and recombination: when RNA meets DNA” *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(8)
2. Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriavali, L., Giulotto, E., & Lingner, J. (2007) “Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends”. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), 798–801
3. Bai Y and Symington LS (1996) “A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genes Dev.* 10(16), 2025-37
4. Baumann P, Cech TR (2001) “Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans”. *Science* 292, 1171-1175
5. Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001) “Telomere position effect in human cells”. *Science*, 292(5524), 2075-2077
6. Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S. and Kerem, B. (2011) “Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development”. *Cell*, 145(3), 435-446
7. Bhattacharjee S and Nandi S (2016) “Choices have consequences: the nexus between DNA repair pathways and genomic instability in cancer”. *ClinTransl Med.* 5(1), 45
8. Bignell, G.R., Greenman, C.D., Davies, H., Butler, A.P., Edkins, S., Andrews, J.M., Buck, G., Chen, L., Beare, D., Latimer, C. and Widaa, S., (2010) “Signatures of mutation and selection in the cancer genome”. *Nature*, 463(7283), 893-898
9. Blackburn EH (2001) “Switching and signaling at the telomere”. *Cell* 106, 661-673
10. Blackburn, E.H., (2005) “Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions”. *FEBS letters*, 579(4), 859-862
11. Blasco A, Lee W, Hande P, Samper E, Lansdorp M, De Pinho A, Greider W (1997) “Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA”. *Cell.* 91, 25-34
12. Blasco MA (2005) “Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond”. *Nat Rev Genet* 6(8), 611-22
13. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) “Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells”. *Science* 279, 349-352
14. Boersma V, et al. (2015) MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. *Nature* 521, 537–540
15. Bolzan A, Bianchi M (2006) “Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations”. *Mutat Res.* 612, 189-214
16. Bosco G and Haber JE (1998) “Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture”. *Genetics* 150(3), 1037-47
17. Bunting, S.F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L. and Xu, X. (2010) “53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks”. *Cell*, 141(2), 243-254
18. Bryan T, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel R (1995) “Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity”. *EMBO J.* 14, 4240-4248
19. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) “Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines”. *Nature medicine* 3, 1271- 1274

20. Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F., and Glover, T.W. (2002) "ATR regulates fragile site stability". *Cell* 111, 779–789
21. Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016) "Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break". *Trends Cell Biol.* 26, 52–64
22. Cervantes BR, Lundblad V (2002) "Mechanisms of chromosome end protection". *Curr Opin Cell Biol.* 14, 351-356
23. Cesare AJ and Griffith JD (2004) "Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops". *Mol Cell Biol.* 24(22), 9948-57
24. Cesare AJ and Reddel RR (2008) "Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres" *Mech Ageing Dev* 129(1-2), 99-108
25. Cesare AJ and Reddel RR (2010) "Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications". *Nat Rev Genet.* 11(5), 319-30
26. Chan SWL and Blackburn EH (2002) "New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin". *Oncogene.* 21, 553-563
27. Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013) "RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection". *Mol. Cell* 49, 858–871
28. Chen Q, Ijima A, Greider CW (2001) "Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events". *Mol Cell Biol.* 21(5), 1819-27
29. Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE (2013) "Repair of double-strand breaks by end joining". *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(5), a012757
30. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T (1995) "A human telomeric protein". *Science* 270, 1663-1667
31. Christodoulidou A, Raftopoulou C, Chiourea M, Papaioannou GK, Hoshiyama H, Wright WE, Shay JW, Gagos S. (2013) "The roles of telomerase in the generation of polyploidy during neoplastic cell growth". *Neoplasia.*15, 156–168
32. Chuang, T.C.Y., Moshir, S., Garini, Y., Chuang, A.Y.C., Young, I.T., Vermolen, B., Van den Doel, R., Mougey, V., Perrin, M., Braun, M. and Kerr, P.D., (2004) "The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells". *BMC biology*, 2(1), 1-8
33. Ciccio, A. and Elledge, S.J. (2010) "The DNA damage response: making it safe to play with knives". *Molecular cell*, 40(2), 179-204
34. Collins, K. and Greider, C.W. (1993) "Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation". *Genes & development*, 7(7b), 1364-1376
35. Conomos D, Pickett HA, Reddel RR (2013) "Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture". *Front Oncol.* 3, 27
36. Cooke HJ, Smith BA (1986) "Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region". *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 213-219
37. Daley JM, Palmbo PL, Wu D, Wilson TE (2005) "Nonhomologous end joining in yeast". *Annu Rev Genet.* 39, 431-51
38. Daniel, A., St Heaps, L., Sylvester, D., Diaz, S. and Peters, G., (2008) "Two mosaic terminal inverted duplications arising post-zygotically: Evidence for possible formation of neo-telomeres". *Cell & chromosome*, 7(1), 1-8
39. de Lange T (1992) "Human telomeres are attached to the nuclear matrix". *EMBO J.* 11, 717-24

40. de Lange T (2005) “Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres”. *Genes & development* 19, 2100-2110
41. de Lange T (2009) “How telomeres solve the end-protection problem”. *Science* 326(5955), 948-52
42. de Lange T, Petrini J. (2000) “A new connection at human telomeres: Association of the Mre11 complex with TRF2”. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* LXV, 265–273
43. de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE (1990) “Structure and variability of human chromosome ends”. *Mol Cell Biol.* 10(2), 518-27
44. de Lange T (2002) “Protection of mammalian telomeres”. *Oncogene* 21, 532-40
45. de Lange, T. (2004) “T-loops and the origin of telomeres”. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 323–329
46. Dev, H., Chiang, T.W.W., Lescale, C., de Krijger, I., Martin, A.G., Pilger, D., Coates, J., Sczaniecka-Clift, M., Wei, W., Ostermaier, M. and Herzog, M. (2018) “Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells”. *Nature cell biology*, 20(8), 954-965
47. Dilley, R.L., and Greenberg, R.A. (2015) “Alternative telomere maintenance and cancer”. *Trends Cancer* 1, 145–156
48. Donnianni RA and Symington LS (2013) “Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis” *Proc Natl Acad Sci USA* 110(33), 13475-80
49. Draskovic, I., Arnoult, N., Steiner, V., Bacchetti, S., Lomonte, P., and Londono Vallejo, A. (2009) “Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15726–15731
50. Durkin, S.G., and Glover, T.W. (2007) “Chromosome fragile sites”. *Annu. Rev. Genet.* 41, 169–192
51. Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C (2017) “Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review”. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26(1), 3-10
52. Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkáč, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al. (2013) “A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice”. *Mol. Cell* 49, 872–883
53. Feichtinger, W., and Schmid, M. (1989) “Increased frequencies of sister chromatid exchanges at common fragile sites” (1) (q42) and (19) (q13). *Hum. Genet.* 83, 145–147
54. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. (1995) “The RNA component of human telomerase”. *Science* 269(5228), 1236-41
55. Gagos, S., Irminger-Finger I. (2005) “Chromosome instability in neoplasia: chaotic roots to continuous growth” *Biochem Cell Biol. J.* 37(5), 1014-33
56. Galati, A., Micheli, E. and Cachione, S. (2013) “Chromatin structure in telomere dynamics”. *Frontiers in oncology*, 3, 46
57. Gisselsson D, Pettersson L, Høglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N (2000) “Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5357-5362
58. Glover, T.W., and Stein, C.K. (1987) “Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites”. *Am. J. Hum. Genet.* 41, 882–890

59. Greider CW (1996) "Telomere length regulation". *Annu Rev Biochem.* 65, 337-365
60. Greider CW (2016) "Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model". *Genes Dev.* 30(13), 1483-91
61. Griffith J, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R, Bianchi A, Moss H, De Lange T (1999) "Mammalian telomeres end in a large duplex loop". *Cell* 97, 503-514
62. Grobelny J, Godwin A, Broccoli D (2000) "ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle". *J Cell Sci.* 113 Pt 24, 4577-85
63. Goldstein M, Kastan MB. (2015) The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med.*, 66, 129–143
64. Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., Typas, D., Lammers, M., Mailand, N., Nussenzweig, A., Lukas, J., & Choudhary, C. (2018) "DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity". *Cell*, 173(4), 972–988.e23
65. Halazonetis T, Gorgoulis V, Bartek J (2008) "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development" *Science.* 319(5868), 1352-5
66. Harle-Bachor C, Boukamp P (1996) "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes" *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 6476-64781
67. Harley C, Futcher AB, Greider CW (1990) "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts". *Nature* 346, 866–868.
68. Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, Robinson MO (1997) "Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits" *Genes Dev* 11(23), 3109-15
69. Hayflick, L. (1965) "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains". *Exp. Cell Res.* 37, 614–636
70. Heaphy, C.M., Subhawong, A.P., Hong, S.M., Goggins, M.G., Montgomery, E.A., Gabrielson, E., Netto, G.J., Epstein, J.I., Lotan, T.L., Westra, W.H., et al. (2011) "Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes". *Am. J. Pathol.* 179, 1608–1615
71. Hellman, A., Zlotorynski, E., Scherer, S.W., Cheung, J., Vincent, J.B., Smith, D.I., Trakhtenbrot, L. and Kerem, B. (2002) "A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes". *Cancer cell*, 1(1), 89-97
72. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AY, Pickett HA, Reddel RR (2009) "DNA C- circles are specific and quantifiable markers".
73. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR (2002) "Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells". *Oncogene* 21(4), 598-610
74. Hines WC, Fajardo AM, Joste NE, Bisoffi M, Griffith JK (2005) "Quantitative and spatial measurements of telomerase reverse transcriptase expression within normal and malignant human breast tissues". *Mol Cancer Res.* 3, 503-509
75. Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) "The DNA-damage response in human biology and disease". *Nature*, 461(7267), 1071-1078
76. Jacobs JJ, de Lange T (2005) "p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway". *Cell cycle* 4, 1364-1368
77. Kaufmann WK (1989) "Pathways of human cell post-replication repair". *Carcinogenesis.* 10, 1-11
78. Kawanishi S, Oikawa S (2004) "Mechanism of telomere shortening by oxidative stress". *Ann NY Acad Sci.* 1019, 278–284

79. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) “Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer”. *Science* 266(5193), 2011-5
80. Koering, C.E., Pollice, A., Zibella, M.P., Bauwens, S., Puisieux, A., Brunori, M., Brun, C., Martins, L., Sabatier, L., Pulitzer, J.F. and Gilson, E. (2002) “Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity”. *EMBO reports*, 3(11), 1055-1061
81. Kural-Mangıt E, Dinçer PR. (2021) “Physical evidence on desmin-lamin B interaction”. *Cytoskeleton (Hoboken)*. Jan;78(1):14-17
82. LeBeau, M.M., and Rowley, J.D. (1984) “Heritable fragile sites in cancer”. *Nature* 308, 607–608
83. Lemaçon, Delphine, Jessica Jackson, Annabel Quinet, Joshua R. Brickner, Shan Li, Stephanie Yazinski, Zhongsheng You et al. (2017) “MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells”. *Nature communications* 8, no. 1, 1-12
84. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) “Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase”. *Science* 276(5312), 561-7
85. Llorente B, Smith CE, Symington LS (2008) “Break-induced replication: what is it and what is it for?” *Cell Cycle* 7(7), 859-64
86. Londono-Vallejo AJ (2004) “Telomere length heterogeneity and chromosome instability”. *Cancer Lett.* 212, 135-144
87. Longhese MP (2008) “DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres”. *Genes Dev* 22(2), 125-40
88. Luderus, M.E., Van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O.C., Cremers, F.F. and De Lange, T. (1996) “Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex”. *The Journal of cell biology*, 135(4), 867-881
89. Lydeard J, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE (2007) “Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32”. *Nature* 448(7155), 820-3
90. Ma Y, Lu H, Schwarz K, Lieber MR (2005) “Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model”. *Cell Cycle* 4(9), 1193-200
91. Makarov L, Hirose Y, Langmore P (1997) “Long G-tails at both ends of human chromosomes suggest a C-strand degradation mechanism for telomere shortening”. *Cell* 88, 657-666
92. Makarov VL, Lejnine S, Bedoyan J, Langmore JP (1993) “Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat”. *Cell* 73, 775-787
93. Malkova A, Ivanov EL, Haber JE (1996) “Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication”. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(14), 7131-6
94. Maser RS, DePinho RA (2004) “Telomeres and the DNA damage response: why the fox is guarding the henhouse”. *DNA repair* 3, 979-988
95. Mathon, N.F. and Lloyd, A.C. (2001) “Cell senescence and cancer”. *Nature reviews cancer*, 1(3), 203-213
96. McEachern JM, Krauskopf A, Blackburn HE (2000) “Telomeres and their control”. *Annu Rev Genet.* 34, 331-358
97. Mehta A and Haber JE (2014) “Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair”. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(9), a016428

98. Miller, C.T., Lin, L., Casper, A.M., Lim, J., Thomas, D.G., Orringer, M.B., Chang, A.C., Chambers, A.F., Giordano, T.J., Glover, T.W. and Beer, D.G., (2006) "Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathways in esophageal adenocarcinoma". *Oncogene*, 25(3), 409-418
99. Milner, Derek J., Georg Weitzer, Duyen Tran, Allan Bradley, and Yassemi Capetanaki (1996) "Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin." *The Journal of cell biology* 134, 5, 1255-1270
100. Molenaar C, Wiesmeijer K, Verwoerd NP, Khazen S, Eils R, Tanke HJ, Dirks RW (2003) "Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes". *EMBO J.* 22(24), 6631-41
101. Muller HJ (1938) "The remaking of chromosomes". *Collecting Net.* 13, 181-198
102. Muntoni, A., Reddel, R.R. (2005) "The first molecular details of ALT in human tumor cells". *Hum. Mol. Genet.* 14, 191-6
103. Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF (1994) "Telomere dynamics in an immortal human cell line". *EMBO J.* 13(20), 4953-62
104. Nieminuszczy, J., Broderick, R., Bellani, M.A., Smethurst, E., Schwab, R.A., Cherdyntseva, V., Evmorfopoulou, T., Lin, Y.L., Minczuk, M., Pasero, P., Gagos, S., (2019) "EXD2 protects stressed replication forks and is required for cell viability in the absence of BRCA1/2". *Molecular cell*, 75(3), 605-619
105. Nikitina T, Woodcock CL (2004) "Closed chromatin loops at the ends of chromosomes". *The Journal of cell biology* 166, 161-165
106. O'Sullivan RJ and Karlseder J (2010) "Telomeres: protecting chromosomes against genome instability". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(3), 171-81
107. O'Sullivan, R.J., Arnoult, N., Lackner, D.H., Oganessian, L., Haggblom, C., Cor-pet, A., Almouzni, G., and Karlseder, J. (2014) "Rapid induction of alternative lengthening of telomeres by depletion of the histone chaperone ASF1". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 167-174
108. Ochs, F., Somyajit, K., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, J., and Lukas, C. (2016) "53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 714-721
109. Olovnikov MA (1973) "A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon". *Journal of Theoretical Biology* 41, 181-190
110. Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, et al. (2004) "Inactivation of hCPC4 can cause chromosomal instability". *Nature* 428, 77-81
111. Reddel, R.R. (2014) "Telomere maintenance mechanisms in cancer: clinical implications". *Curr. Pharm. Des.* 20, 6361-6374
112. Rizki A, Lundblad V. (2001) "Defects in mismatch repair promote telomerase independent proliferation". *Nature.* 411, 713-716
113. Roschke A, Kirsch I (2010) "Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells". *Curr Drug Targets* 11(10), 1341-50
114. Roumelioti FM, Sotiriou SK, Katsini V, Chiourea M, Halazonetis TD, Gagos S (2016) "Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication". *EMBO Rep.* 17(12), 1731-1737
115. Sabatier, L., Ricoul, M., Pottier, G. and Murnane, J.P. (2005) "The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line". *Molecular cancer research*, 3(3), 139-150

116. Sakellariou, D., Chiourea, M., Raftopoulou, C., Gagos, S. (2013) “Alternative lengthening of telomeres: recurrent cytogenetic aberrations and chromosome stability under extreme telomere dysfunction”. *Neoplasia* 15, 1301-13
117. San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008) “Mechanism of eukaryotic homologous recombination”. *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 229-257
118. Sandin S, Rhodes D. (2014) “Telomerase structure”. *Current opinion in structural biology* 25, 104-110
119. Scheel C, Schaefer KL, Jauch A, Keller M, Wai D, Brinkschmidt C, van Valen F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B, Poremba C. (2001) “Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas”. *Oncogene* 20, 3835–3844
120. Schwertman P, Bekker-Jensen S, Mailand N. (2016) Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17, 379–394
121. Selvarajah S, Yoshimoto M, Park PC, Maire G, Paderova J, Bayani J, Lim G, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M (2006) “The breakage-fusion-bridge (BFB) cycle as a mechanism for generating genetic heterogeneity in osteosarcoma”. *Chromosoma* 115, 459-467
122. Setiাপutra, D., & Durocher, D. (2019) “Shieldin—the protector of DNA ends”. *EMBO reports*, 20(5), e47560
123. Sfeir A., Kosiyatrakul S., Hockemeyer D., MacRae S., Karlseder J., Schildkraut C., 2 and Titia de Lange (2009) “Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication”. *Cell* 138, 90-103
124. Shay JW and Bacchetti S (1997) “A survey of telomerase activity in human cancer”. *Eur J Cancer* (5), 787-91
125. Shay, J.W., Reddel, R.R. and Wright, W.E. (2012) “Cancer and telomeres—an ALTERNative to telomerase”. *Science*, 336(6087), 1388-1390.
126. Shay JW, Wright WE (2004) “Telomeres are double-strand DNA breaks hidden from DNA damage responses”. *Molecular cell* 14, 420-421
127. Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001) “Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging”. *Radiation research*, 155(1), 188-193
128. Slijepcevic P, Al-Wahiby S (2005) “Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response”. *Chromosoma* 114, 275-285
129. Sobinoff, A.P., Allen, J.A., Neumann, A.A., Yang, S.F., Walsh, M.E., Henson, J.D., Reddel, R.R., and Pickett, H.A. (2017) “BLM and SLX4 play opposing roles in recombination-dependent replication at human telomeres”. *EMBO J.* 36, 2907–2919
130. Soman, A., Liew, C.W., Teo, H.L., Berezchnoy, N.V., Olieric, V., Korolev, N., Rhodes, D. and Nordenskiöld, L. (2020) “The human telomeric nucleosome displays distinct structural and dynamic properties”. *Nucleic acids research*, 48(10), 5383-5396
131. Stratton, M.R. (2011) “Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise”. *Science* 331(6024), 1553-1558
132. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003) “DNA damage foci at dysfunctional telomeres”. *Current biology* CB 13, 1549-1556
133. Teng SC and Zakian VA (1999) “Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Mol Cell Biol.* 19(12), 8083-93

134. Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA (2000) “Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process”. *Mol Cell* 6(4), 947-52
135. Verdun, R.E. and Karlseder, J. (2007) “Replication and protection of telomeres”. *Nature*, 447(7147), 924-931
136. Viscardi V, Clerici M, Cartagena-Lirola H, Longhese MP (2005) “Telomeres and DNA damage checkpoints”. *Biochimie* 87, 613-624
137. Von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C (1995) “Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?” *Exp Cell Res.* 220, 186-193
138. Watson JD (1972) “Origin of Concatemeric T7DNA”. *Nature New Biology* 239, 197-201
139. Weipoltshammer, K., Schöfer, C., Almeder, M., Philimonenko, V.V., Frei, K., Wachtler, F. and Hozák, P. (1999) “Intranuclear anchoring of repetitive DNA sequences: centromeres, telomeres, and ribosomal DNA”. *The Journal of cell biology*, 147(7), 1409-1418
140. Wellinger RJ and Zakian VA (2012) “Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end”. *Genetics* 191(4), 1073-105
141. Wright WE, Shay JW (2005) “Telomere-binding factors and general DNA repair”. *Nature genetics* 37, 116-118
142. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR (1999) “Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body”. *Cancer Res.* 59(17), 4175-9
143. Yu, E.Y., Pérez-Martín, J., Holloman, W.K., and Lue, N.F. (2015) “Mre11 and Blm-dependent formation of ALT-like telomeres in Ku-deficient *Ustilago maydis*”. *PLoS Genet.* 11, e1005570
144. Yunis, J.J., and Soreng, A.L. (1984) “Constitutive fragile sites and cancer”. *Science* 226, 1199–1204
145. Zeman, M.K. and Cimprich, K.A., (2014) “Causes and consequences of replication stress”. *Nature cell biology* 16(1), 2-9
146. Zhang Q, Williams ES, Askin KF, Peng Y, Bedford JS, Liber HL, Bailey SM (2005) “Suppression of DNA-PK by RNAi has different quantitative effects on telomere dysfunction and mutagenesis in human lymphoblasts treated with gamma rays or HZE particles”. *Radiation research* 164, 497-504
147. Zhang, S., Yao, L., Sun, A. and Tay, Y., (2019) “Deep learning based recommender system: A survey and new perspectives”. *ACM Computing Surveys (CSUR)*, 52(1), 1-38