



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ

*Μελέτη του ρόλου επιγενετικών μηχανισμών και των μηχανισμών
μεταγωγής σήματος στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης: η
λειτουργία των CS πρωτεϊνών.*









Διδακτορική Διατριβή

Κατερίνας- Ζωής Ντάκου-Ζαμπλάρα

Βιολόγου BSc, MSc

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΘΕΟΧΑΡΗΣ

Μάιος 2018

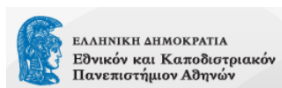
 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΛΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ. 
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
 Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Η Τριμελής Επιτροπή:

- 1) Δρ. Σ. Θεοχάρης, Καθηγητής,
Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

- 2) Δρ. Ε. Πατσούρης, Καθηγητής,
Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

- 3) Δρ. Μ. Φουστέρη, Ερευνήτρια Β,
Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ: 22/2/2012

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 9/10/2012

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 6/3/2013

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 25/4/2018

Ευχαριστίες

Με τη λήξη αυτού του υπέροχου ταξιδιού, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκείνους οι οποίοι συνέβαλαν πρακτικά και μη, καθώς τίποτε δεν θα ήταν το ίδιο καλό σήμερα χωρίς αυτούς.

Ευχαριστώ θερμά

Τη **Δρ. Μαρία Φουστέρη**, ερευνήτρια Β' (ΕΚΕΒΕ Φλέμινγκ), γιατί δίνοντάς μου την ευκαιρία να δουλέψω στο project της, έγινε η βασική αιτία που βρήκα ενδιαφέρον στην έρευνα. Την ευχαριστώ για την ουσιαστική καθοδήγησή της, τις πολύτιμες συμβουλές της, τις καίριες κατευθύνσεις της, την έρευνα υψηλού επιπέδου, τη δυνατότητα για ό,τι πιο σύγχρονο. Για τη συνεχή και ουσιαστική επίβλεψή της, που παράλληλα άφηνε χώρο και ελευθερία για σκέψη και πρωτοβουλία, καθιστώντας με έτσι πιο ώριμη και κινητοποιημένη επιστημονικά. Η εμπιστοσύνη και η συνεχής τόνωση του ηθικού μου από μέρους της, έκανε την απαιτητική και συχνά επίπονη ερευνητική πορεία να μοιάζει μ' ένα διασκεδαστικό παιχνίδι γνώσεων, εξάσκησης του νου και επιμονής για τον τελικό στόχο. Τέλος, για την φιλία, την αγάπη της, και για την όμορφη βαφτιστήρα που μου χάρισε, πάντα θα την ευχαριστώ.

Τον Δρ. Matthieu Lavigne για την άμεση και συνεχή επίβλεψή του, για την καθημερινή και ουσιαστική υποστήριξή του, για τις πολύτιμες συμβουλές και κατευθύνσεις του, για τις γνώσεις και την τεχνική που μου μετέδωσε, για την μύησή μου στην όλη φιλοσοφία των βιολογικών επιστημών, για τον ξεχωριστό τρόπο σκέψης του, για το ιδανικό κλίμα συνεργασίας και για την βιοπληροφορική ανάλυση. Τον ευχαριστώ γιατί μετέτρεψε κάθε μου λεπτό στο εργαστήριο σε μοναδική εμπειρία γνώσης, ανακάλυψης και χαράς.

Τον Δημήτρη Κωνσταντόπουλο: Για την πολύτιμη βοήθειά του στην βιοπληροφορική ανάλυση.

Τον καθηγητή Σταμάτη Θεοχάρη του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ (Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής) για την σημαντική υποστήριξη και συμβουλευτική του, ως υπεύθυνος της Τριμελούς μου Επιτροπής, καθώς και τον **καθηγητή Ευστράτιο Πατσούρη** του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ και Διευθυντή του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και την εμπιστοσύνη του από τα χρόνια του μεταπτυχιακού μου διπλώματος στον ίδιο τομέα.

Τα μέλη της Επταμελούς μου Επιτροπής: **Δήμα Αντιγόνη**, Ερευνήτρια Γ' (ΕΚΕΒΕ Αλ. Φλέμινγκ), **Χατζή Παντελή**, Ερευνητή Γ' (ΕΚΕΒΕ Αλ. Φλέμινγκ), **Κορκολοπούλου Πηνελόπη**,

Καθηγήτρια (Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής), **Πιπέρη Χριστίνα**, (Αν. Καθηγήτρια Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας).

Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου της Δρ. Φουστέρη: **Γιώργο Στέφο, Σμαράγδα Φανουργάκη, Τάσο Λιάκο, Ζωή Σπυροπούλου, Eszter Szantai**: για το πολύ καλό καθημερινό κλίμα, για την άψογη συνεργασία, για την εποικοδομητική ανταλλαγή ιδεών, για την αλληλοβοήθεια και τη στήριξη, αλλά και για τις άπειρες στιγμές γέλιου, που έκαναν κάθε μέρα πιο ευχάριστη.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον **Γιάννη Αμπατζιάδη** για την ανιδιοτελή υποστήριξή του, την παροιμιώδη ηρεμία του, την απίστευτη κατανόησή του, τη συνεχή ανταλλαγή απόψεων και ιδεών, τις άκρως βοηθητικές συζητήσεις, για το ότι ήταν ένας πολύτιμος συμπορευτής ετών και τη **Βίκυ Ζάρκου**, για το συνεχές ενδιαφέρον και για την απλόχερη προσφορά της. Αλλά κυρίως ευχαριστώ και τους δύο για τις φιλίες ζωής, που κέρδισα ανέλπιστα, μέσα από έναν εργασιακό χώρο.

Τους Δρ. Παντελή Χατζή και Δρ. Ιάννη Ταλιανίδη και τα μέλη των εργαστηρίων τους για την ανταλλαγή ιδεών, για τις συζητήσεις, για τις προτάσεις, για τα σχόλια και για την όλη βοήθειά τους.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, γιατί χωρίς την δική τους στήριξη και αγάπη, δεν θα ήμουν εγώ η ίδια σήμερα.

Ευχαριστώ από καρδιάς

Τον Σταύρο. Τον σύντροφο και σύζυγό μου, τον φίλο και συνεργάτη μου, που χρόνια τώρα, είναι πάντα εκεί για να με στηρίζει ακούραστα, να με θαυμάζει ειλικρινά, να με «σηκώνει» άμεσα, να με εξελίσσει ουσιαστικά, να με συμβουλεύει αντικειμενικά, να με ακούει πραγματικά, να με αγκαλιάζει φανατικά, να μ' αγαπάει σπάταλα.

Την Έρρη. Για την ήρεμη δύναμή της, για την αίσθηση ασφάλειας, για την απόλυτη εμπιστοσύνη της, για την ψυχολογική και υλική υποστήριξή της, για τη διακριτική παρουσία της, για την αμέριστη πίστη της σ' εμένα, για την υπέροχη φροντίδα της, για την αστείρευτη αγάπη της. Γιατί είναι ό,τι καλύτερο θα μπορούσα να φανταστώ και να έχω σε μαμά!

Τον μπαμπά μου. Γιατί αν και «έφυγε» νωρίς, πρόφτασε να με εφοδιάσει με τόση αγάπη που φτάνει για 10 ζωές. Πρόφτασε να με θωρακίσει με πίστη και σιγουριά για τον εαυτό μου, πρόφτασε να μου δώσει γνώσεις και ηθικές αξίες. Τον ευχαριστώ για την απεριόριστη

εμπιστοσύνη, την ηρεμία, την ποιότητα και το φως που άφησε στη ζωή μου. Στη μνήμη του αυτό και ό,τι κάνω.

Τη γιαγιά μου. Στην συνονόματη γιαγιά μου - την Καιτούλα μου -, που την έχασα πριν λίγους μήνες και, που τελευταία, ξυπνούσε και κοιμόταν με τον ίδιο καημό: αυτόν του «δικτατορικού» μου!!! Στη μνήμη της λοιπόν αυτό το «δικτατορικό»!

Τους φίλους μου. Γιατί είναι πραγματικά η «περιουσία μου». Γιατί χωρίς αυτούς να με χαλαρώνουν, να με πιστεύουν και να με αγαπούν, όλα θα ήταν πιο δύσκολα και πιο αγχωτικά. Ιδιαίτερες ευχαριστίες **στην Εύη**, για τα υπέροχα διαλείμματα χαράς, που μου χάριζε καθημερινά, με κάθε τρόπο, αλλά και για το ότι «με έτρεχε», κυριολεκτικά, σε κάθε λογής ημιμαραθώνιους, για να κρατιέμαι fit! **Στη Σοφία**, για το ειλικρινές νοιάξιμο, την υποστήριξη, την πίστη σε εμένα και τέλος για τη φιλολογική ανάγνωση του κειμένου.

Βιογραφικό Σημείωμα

Ντάκου - Ζαμπλάρα Κατερίνα - Ζωή

Βιολόγος, MSc

Υποψήφια Διδάκτωρ, Καθηγήτρια Βιολογίας Μέσης Εκπαίδευσης

Εκπαίδευση

- 10/2012 - Σήμερα: **Υποψήφια Διδάκτωρ (PhD Candidate)**, Τμήμα Ιατρικής ΕΚΠΑ και Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ, Εργαστήριο Δρ. Φουστέρη
Τίτλος διατριβής: “Μελέτη του ρόλου επιγενετικών μηχανισμών και των μηχανισμών μεταγωγής σήματος στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης: Η λειτουργία των CS πρωτεϊνών.”
- 05/2017- 04/2018 : **Ετήσιο Πρόγραμμα Εξειδίκευσης στην Ειδική Αγωγή ΕΚΠΑ,**
Ένωση Ελλήνων Φυσικών (Ε.Ε.Φ)
- 09/2009- 09/2011: **Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών (MSc)**, Τμήμα Ιατρικής ΕΚΠΑ
Τίτλος: “Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: σύγχρονη κλινικοπαθολογοανατομική προσέγγιση και έρευνα”
Βαθμός: **“Άριστα”**
- 09/2003 - 09/2008: **Πτυχίο Βιολογίας (BSc), Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ**
Βαθμός **“Λίαν καλώς”**
- Ιούν 2003: **Απολυτήριο Λυκείου, Ιδιωτικό Ενιαίο Λύκειο “Ν. Μαλλιάρα”**
Βαθμός **“Άριστα”**

Επαγγελματική εμπειρία

- 09/2016 – Σήμερα: **Καθηγήτρια Βιολογίας, Νέα Εκπαιδευτήρια Γ. Μαλλιάρα**
- 11/2016 – 06/2017: **Καθηγήτρια Βιολογίας, Γενικό Λύκειο Μαραθώνα, 1^ο Γυμνάσιο Αρτέμιδας**
- 10/2012 - Σήμερα: **Υποψήφια Διδάκτωρ (Μεταπτυχιακή Υπότροφος),** Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”,
Εργαστήριο Δρ. Φουστέρη, Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής
- 10/2011 - 06/2012: **Καθηγήτρια Βιολογίας, 1^ο Γενικό Λύκειο Περάματος, 5^ο Γενικό Λύκειο Νίκαιας**
- 09/2010 - 08/2012: **Εκπόνηση μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, Τεχνική ερευνητική υποστήριξη**
Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ” , Εργαστήριο Δρ. Κωστούρου, Τομέας Ανοσολογίας
- 4/2008 – 9/2008: **Πρακτική Άσκηση, Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος,**
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά (Proficiency)

Ιταλικά (επίπεδο B2)

Πληροφορική

Κάτοχος ECDL core

Παρουσιάσεις σε συνέδρια

- 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, Egmond aan Zee, The Netherlands, April 17 – 22, 2016. Τίτλος του πόστερ: 'A global switch of RNA polymerase II elongation optimizes the elimination of genotoxic stress'

- EMBO Conference on The DNA damage response in cell physiology and disease, Σούνιο, Αθήνα, 5-9 Οκτωβρίου.

Τίτλος του πόστερ: 'Switching on RNAPII Elongation "safe mode" upon genotoxic attack'

Δημοσιεύσεις

Lavigne MD, Konstantopoulos* D, Ntakou-Zamplara* KZ, Liakos A, Fousteri M., 2017. Global unleashing of transcription elongation waves in response to genotoxic stress restricts somatic mutation rate. Nat Commun. 8(1): 2076. doi: 10.1038/s41467-017-02145-4

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	6
Βιογραφικό Σημείωμα	9
Σκοπός	13
Περίληψη	14
Abstract	15
Εισαγωγή	16
Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA.....	16
Εκτομή νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair).....	17
Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum- XP).....	20
Τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy-TTD).....	20
Σύνδρομο Cockayne	21
Διάγνωση	23
Θεραπεία	24
Μοριακό προφίλ.....	25
Η πρωτεΐνη CSB	25
CS1AN μετάλλαξη	26
Ο ρόλος της CSB πρωτεΐνης.....	27
CSA πρωτεΐνη	29
ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	29
Έναρξη.....	29
Επιμήκυνση.....	31
Τερματισμός.....	31
Οι διαφορετικές ισομορφές της RNA πολυμεράσης II	33
Υπόθεση	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
Διατήρηση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών.....	36
Κατάψυξη και απόψυξη κυτταρικών σειρών	36
Συγχρονισμός κυττάρων	37
UV-C Ακτινοβολήση κυττάρων	38
Έλεγχος ικανότητας δημιουργίας αποικιών έπειτα από UV ακτινοβολήση.....	38
Χημική διασύνδεση DNA - πρωτεϊνών (<i>In vivo</i> crosslinking)	38
Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης CHIP	40
Τα αντισώματα για ανοσοκατακρήμνιση	41
CHIP για Q-PCR και για sequencing (CHIP-QPCR , CHIP-seq).....	42
CHIP-western, ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για ανοσοαποτύπωση κατά western	43
Συλλογή ολικού RNA	45
Επιλογή ώριμου αγγελιοφόρου RNA (mature mRNA)	46
Επιλογή νεοσυντιθέμενου (nascent) RNA	46
Σύνθεση cDNA από nRNA και από mRNA	47
Κατασκευή DNA βιβλιοθηκών για αλληλούχιση.....	48
Αλληλούχιση	51
Ποιοτικός έλεγχος και ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης.....	51
Αναστολή μεταγραφής με τη χρήση DRB.....	52
Εντοπισμός του νεοσυντιθέμενου RNA με ανοσοφθορισμό	52
Damaged-DNA immunoblot analysis (dot- ή slot-blot).....	53

CPD Immunoprecipitation (CPDIP)-seq.....	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (mRNA-seq) πριν και μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA με τη χρήση UV-C ακτινοβολίας.....	55
Μελέτη της μεταγραφής.....	59
Μελέτη των διαφορετικών σταδίων της μεταγραφής.....	60
Επιλογή μεθόδων.....	60
<i>Η UV ακτινοβολία δίνει το έναυσμα στις RNA πολυμεράσες II να ξεκινήσουν την επιμήκυνση της μεταγραφής, στα ενεργά γονίδια.....</i>	<i>64</i>
Έναρξη της μεταγραφής.....	65
Σημείο ελέγχου PPP.....	71
Η απελευθέρωση νέων κυμάτων μεταγραφής ενισχύει την αναγνώριση των βλαβών της διπλής έλικας.....	76
Το νέο κύμα της μεταγραφής εξυπηρετεί στην επιδιόρθωση του DNA.....	79
Η σάρωση του γονιδιώματος μέσω του μεταγραφικού κύματος συντελεί στη διασφάλιση της ακεραιότητάς του και την αποτροπή μεταλλάξεων.....	81
CS-B κύτταρα.....	84
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	95
Ευρετήριο Συντμήσεων.....	100
Βιβλιογραφία.....	102

Σκοπός

Το φυσικό αντικείμενο της παρούσας διατριβής αφορά στην αποκρυπτογράφηση των μοριακών μηχανισμών απόκρισης του κυττάρου, οι οποίοι ενεργοποιούνται μετά από αναστολή της γονιδιακής έκφρασης σε φυσιολογικές καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις. Σκοπός της μελέτης είναι η κατανόηση των ρυθμιστικών αυτών μηχανισμών και της αλληλεπίδρασής τους με τη λειτουργία της μεταγραφής για τη διασφάλιση της πιστής έκφρασης γονιδίων και της ακεραιότητας του γονιδιώματος.

Πιο συγκεκριμένα, μελετάται ο ρόλος των Cockayne Syndrome (CS) πρωτεϊνών στη διασφάλιση της ομαλής γονιδιακής έκφρασης. Το μοντέλο εργασίας αφορά στο ρόλο της Cockayne Syndrome πρωτεΐνης Β (CSB) πρωτεϊνών ως ρυθμιστή της επιμήκυνσης της μεταγραφής μέσω της RNA πολυμεράσης II, και κατ' επέκταση της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης σε φυσιολογικές συνθήκες ή μετά από επίδραση κυτταροτοξικών παραγόντων. Στόχος είναι η συνεισφορά στην εξήγηση της μοριακής βάσης της σύνθετης σχέσης γονότυπου - φαινότυπου, όπως απεικονίζεται στις σπάνιες γενετικές ασθένειες με πολλαπλές δυσλειτουργίες που σχετίζονται με το σύνδρομο Cockayne όπως COFs1, UVSS, DeSanctis Cacchione syndrome και με το συνδυασμό των συνδρόμων Cockayne και της Μελαγχρωματικής ξηροδερμίας (XP).

Η παρούσα μελέτη διακρίνεται σε δύο μέρη. Αρχικά μελετήθηκε η απόκριση των φυσιολογικών κυττάρων στην επίδραση της UV ακτινοβολίας στο επίπεδο της μεταγραφής του DNA. Σκοπός ήταν να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί της μεταγραφής, οι οποίοι εξασφαλίζουν τη γονιδιακή ακεραιότητα μετά από βλάβες στο γενετικό υλικό. Βρέθηκε και περιγράφηκε εκτενώς ένας νέος μοριακός μηχανισμός ανίχνευσης βλαβών DNA, ο οποίος ενεργοποιείται μετά από έκθεση σε μεταλλαξογόνους παράγοντες και είναι άμεσα συνδεδεμένος με την ενεργό μεταγραφή και συγκεκριμένα με την επιμήκυνση της μεταγραφής. Ο μηχανισμός αυτός χαρακτηρίζεται από την εκ νέου απελευθέρωση μεταγραφικών κυμάτων ταυτόχρονα σε όλα τα ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια. Παράλληλα μελετήθηκε η μεταγραφική συμπεριφορά και η απόκριση σε γενοτοξικούς παράγοντες κυττάρων με μεταλλαγμένο το γονίδιο CSB (CS-B κύτταρα). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα CS-B κύτταρα προτείνουν έναν νέο πιθανό ρόλο για τη CSB πρωτεΐνη στη ρύθμιση της μεταγραφής μετά από βλάβη αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Περίληψη

Η μελέτη μας αρχικά επικεντρώθηκε στον τρόπο με τον οποίο τα φυσιολογικά κύτταρα αποκρίνονται στις βλάβες που προκαλεί η υπεριώδης ακτινοβολία στο γονιδίωμα και οι οποίες διακόπτουν την πορεία την μεταγραφή. Βρέθηκε ότι αμέσως μετά την επαγωγή βλαβών ξεκινά η ταυτόχρονη απελευθέρωση RNA πολυμερασών II επιμήκυνσης από τις θέσεις παύσης της μεταγραφής πλησίον των υποκινητών (Promoter proximal pausing sites) προς το 3' άκρο όλων των ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων. Με τον τρόπο αυτόν οι RNA πολυμεράσες, οι οποίες κινούνται κατά μήκος των ενεργών γονιδίων, μεταγράφοντας τα, μεγιστοποιούν τις πιθανότητες να συναντήσουν κάποια βλάβη και να ενεργοποιήσουν άμεσα το υπεύθυνο μονοπάτι επιδιόρθωσης, συντελώντας με τον τρόπο αυτό στην επιτάχυνση της απομάκρυνσής τους. Μια σημαντική συνέπεια του μεταγραφικού αυτού μηχανισμού άμυνας είναι η ομογενής μείωση των μεταλλάξεων σε όλα σχεδόν τα εκφρασμένα γονίδια, όπως βρέθηκε μετά από αλληλούχηση γονιδιωμάτων που είχαν εκτεθεί σε τοξικούς παράγοντες όπως το μελάνωμα και το αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής έχουν δημοσιευθεί πρόσφατα (Lavigne et al., Nature Communications 2017).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η απόκριση των κυττάρων που φέρουν μεταλλαγή στο *ERCC6* γονίδιο (κωδικοποιεί για την CSB πρωτεΐνη), ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της πρωτεΐνης στη ρύθμιση της μεταγραφής πριν και μετά από την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων. Χρησιμοποιώντας αλληλούχηση νεοσυντιθέμενων τμημάτων RNA βρήκαμε, σε αντίθεση με ότι πιστεύονταν, ότι και στα CS-B κύτταρα ξεκινά ένα νέο κύμα μεταγραφής στα αρχικά στάδια έπειτα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, το οποίο όμως είναι πολύ πιο αργό από αυτό που παρατηρείται στα φυσιολογικά κύτταρα. Η μειωμένη ταχύτητα μεταγραφής που παρατηρείται απουσία λειτουργικής CSB πρωτεΐνης οφείλεται πιθανά στην εκτεταμένη παρακώλυση των RNA πολυμερασών στα σημεία DNA βλαβών λόγω της ελαττωματικής επιδιόρθωσης τους σε αυτά τα κύτταρα. Ενώ, η έναρξη της μεταγραφής φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται, οι πολυμεράσες επιμήκυνσης παραμένουν μόνιμα παγιδευμένες στα αρχικά τμήματα των γονιδίων και δεν επιτρέπουν την επανάκαμψη της επιμήκυνσης της μεταγραφής, με αποτέλεσμα την απώλεια ζωτικών μεταγράφων και την ενεργοποίηση μηχανισμών απόπτωσης των CS-B κυττάρων. Τα αποτελέσματα της 2^{ης} ενότητας έχουν συμπεριληφθεί σε μια δημοσίευση η οποία είναι στο στάδιο υποβολής σε διεθνές επιστημονικό περιοδικό (Ntakou-Zamplara et al.).

Abstract

In this study we focused on complex molecular responses that preserve gene expression accuracy and genome integrity in the face of UV irradiation. We revealed a new mechanism in response to UV, in which RNA polymerase II (RNAPII) molecules are dynamically and synchronously released from promoter-proximal pausing sites (PPP) into elongation to promote uniform and accelerated surveillance of the whole transcribed genome. The maximised influx of *de novo* released RNAPII correlates with increased damage-sensing. In turn, this transcription elongation 'safe' mode guarantees efficient DNA repair regardless of damage location, gene size and transcription level. Accordingly, we detect low and homogenous rates of mutational signatures associated with UV exposure or cigarette smoke across all active genes. Our results were recently published (Lavigne et al., Nature Communications 2017).

Moreover, aiming to shed light on the role of Cockayne Syndrome protein B (CSB) protein in transcription reorganization after damage, we studied the response of cells with defective CSB to UV irradiation. Using nascent RNA sequencing, we revealed a new wave of transcription released from PPP as an early response to UV in contrast to previous studies. This *de novo* wave is characterized by a slower rate in comparison to normal cells possibly due to the blockage of RNAPII molecules at damaged sites. Whereas the initiation of transcription seems unaffected, the elongating polymerases remain trapped in areas close to the 5' prime end of long genes, preventing the recovery of transcription. As a result, Cockayne Syndrome cells lacking vital transcripts eventually activate apoptotic pathways. The results of the second part of this study are included in a manuscript which is under submission for publication (Ntakou-Zamplara et al.).

Εισαγωγή

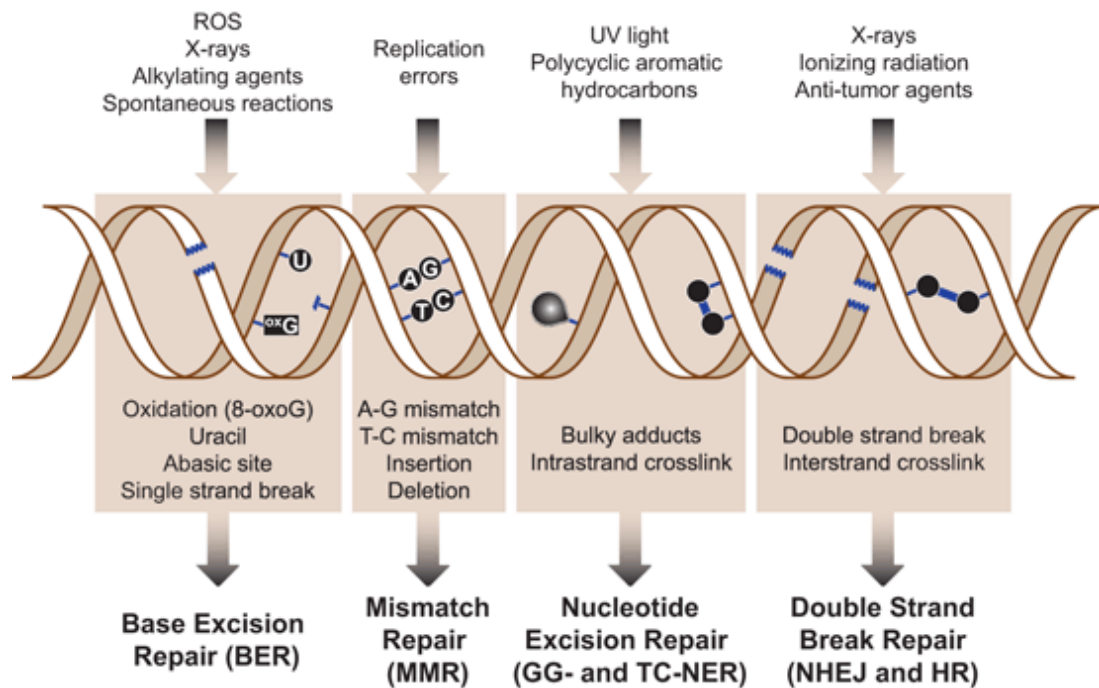
Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA

Το DNA αποτελεί το γενετικό υλικό των κυττάρων. Η διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού είναι βασική για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων καθώς και για την πιστή μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας. Ωστόσο καθημερινά το γενετικό υλικό όλων των ζωντανών οργανισμών απειλείται από εξωγενείς μεταλλαξογόνους παράγοντες, όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, καθώς και από ενδογενείς, όπως το οξειδωτικό στρες. Οι βλάβες που προκύπτουν στο DNA μπορούν να επηρεάσουν άμεσα το κύτταρο είτε αλλάζοντας τη δομή της χρωματίνης και παρεμποδίζοντας βασικούς μηχανισμούς του κυττάρου, όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή, είτε αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο. Οι παραπάνω διαταραχές είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε κυτταρικό γηρασμό, απόπτωση ή κυτταρικό θάνατο καθώς και σε μόνιμες μεταλλαγές στο γενετικό υλικό με συνέπεια ασθένειες όπως ο καρκίνος ή η πρόωρη γήρανση.

Προκειμένου να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της γενετικής πληροφορίας υπάρχει ένα δίκτυο επιδιορθωτικών μηχανισμών, συντηρημένων από την *E.coli* έως τα θηλαστικά. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA παρουσιάζουν εξειδίκευση ανάλογη με τον τύπο της βλάβης.

Συνοπτικά, ο επιδιορθωτικός μηχανισμός με εκτομή βάσης (Base excision repair - BER) είναι υπεύθυνος για την επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται κυρίως εξαιτίας παραπροϊόντων του μεταβολισμού (ελεύθερες ρίζες και αντιδρώντα είδη οξυγόνου) αλλά και τοξικών ουσιών του περιβάλλοντος. Οι βλάβες αυτές μπορεί να είναι είτε αλλοιώσεις στη βάση ενός νουκλεοτιδίου (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ή απαμίνωση) είτε θραύση της μίας αλυσίδας του DNA. Βλάβες και στις δύο αλυσίδες του DNA που δύναται να προκληθούν από ιονίζουσα ακτινοβολία επιδιορθώνονται μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (homology-dependent recombination) και της ένωσης μη ομόλογων τελικών άκρων (DNA-end joining). Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγαριών (Mismatch repair – MMR) επιδιορθώνει λανθασμένο ζευγάριμα βάσεων, προσθήκες ή ελλείψεις βάσεων που προκύπτουν μετά την αντιγραφή του DNA. Τέλος, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair- NER), ο οποίος μελετάται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναγνωρίζει και αποκαθιστά βλάβες που διαταράσσουν τη δομή της διπλής έλικας του DNA και προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία και αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Η απομάκρυνση βλαβών DNA που

διαταράσσουν τη δομή της διπλής έλικας του DNA και προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία και αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Η απομάκρυνση βλαβών DNA που παρεμποδίζουν τη μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης II (RNAPII) και αναστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση αποτελεί άμεση προτεραιότητα για το κύτταρο.



Εικόνα 1 Dexeimer T. (2013) *DNA Repair Pathways and Mechanisms*. Παρουσιάζονται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA ανάλογα με τον τύπο της βλάβης που προκαλείται από διαφορετικούς παράγοντες.

Εκτομή νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair)

Η επιδιόρθωση μέσω του μηχανισμού εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair- NER) είναι υπεύθυνη για την επιδιόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό που προκαλούν διμερή πυριμιδινών ή 6-4 φωτοπροϊόντα και επάγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου. Με τον ίδιο μηχανισμό επίσης επιδιορθώνονται ογκώδεις αλλοιώσεις στη δομή της διπλής έλικας του DNA που επάγονται από την πλατίνη και την καρβοπλατίνη, συστατικά πολλών χημειοθεραπευτικών σχημάτων.

Στα κύτταρα των θηλαστικών η επιδιόρθωση μέσω του NER διακρίνεται σε δύο υπο-μονοπάτια: στην επιδιόρθωση βλαβών από περιοχές χρωματίνης που μεταγράφονται και ονομάζεται Transcription-Coupled Repair (TC- NER) και στην επιδιόρθωση βλαβών από όλο το γενωμικό DNA ανεξάρτητα αν μεταγράφεται ή όχι, που ονομάζεται Global Genome Repair

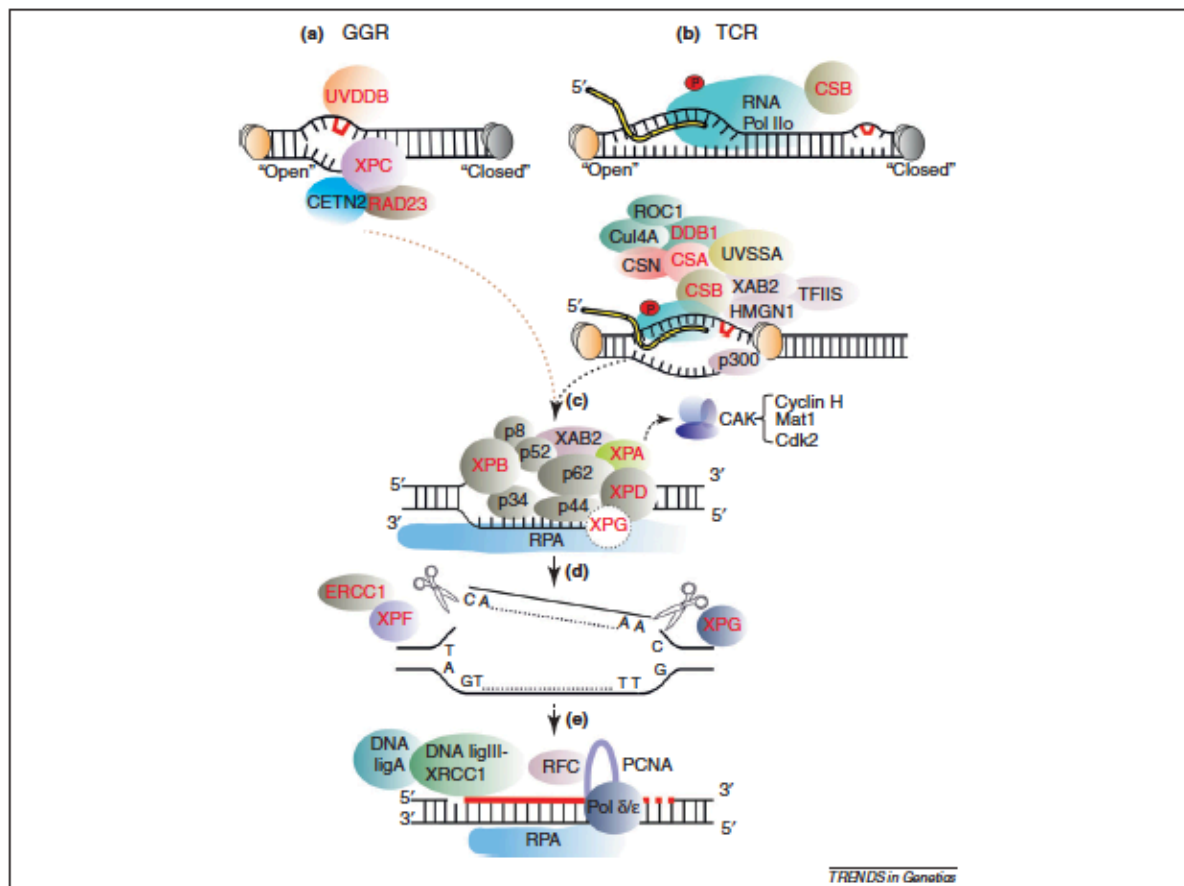
(GG-NER). Τα δύο αυτά μονοπάτια επιδιόρθωσης διαφέρουν στον τρόπο αναγνώρισης της βλάβης και ενεργοποίησης του μηχανισμού, ενώ το κύριο τμήμα του μηχανισμού που αφορά στην εκτομή των τμημάτων χρωματίνης που φέρουν τη βλάβη καθώς και η αντικατάστασή τους από νέο-συντιθέμενο DNA είναι κοινό και για τα δύο υπο- μονοπάτια.

Κατά το GG-NER, η βλάβη αναγνωρίζεται από ένα σύμπλοκο τριών πρωτεϊνών, το XPC-RAD23B και από το σύμπλοκο της . Στη συνέχεια για το ξεδίπλωμα της διπλής έλικας του DNA και τη σταθεροποίησή της, απαραίτητος είναι ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας II H (TFIIH), μαζί με την Xeroderma Pigmentosum protein A (XPA), τη Replication Protein A (RPA) και την 3' ενδονουκλεάση Xeroderma Pigmentosum protein G (XPG). Ακολούθως η XPG μαζί με το σύμπλοκο των ERCC1-XPF κόβουν στο 3' και 5' άκρο του τμήματος DNA που περιέχει τη βλάβη, αντίστοιχα. Οι DNA πολυμεράσες δ και ϵ καθώς και η DNA πολυμεράση κ συνθέτουν εκ νέου τα νουκλεοτίδια που αφαιρέθηκαν χρησιμοποιώντας ως καλούπι τη συμπληρωματική DNA αλληλουχία (patch-repair synthesis). Τελικά οι DNA λιγάσες III και I, ενώνουν τη νέο-συντιθέμενη αλληλουχία με το υπόλοιπο DNA (Gillet and Schärer 2006; Kamileri et al. 2012).

Η παρατεταμένη αναστολή της μεταγραφής του DNA έχει δραματικές συνέπειες για τα κύτταρα και κατά συνέπεια για τους οργανισμούς. Για τον λόγο αυτό η απομάκρυνση βλαβών DNA που παρεμποδίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων μέσω της RNA πολυμεράσης II (RNAPII) και αναστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση αποτελεί άμεση προτεραιότητα για το κύτταρο. Κατά το TC-NER, η βλάβη αναγνωρίζεται από την RNAPII, της οποίας η πορεία διακόπτεται μετά από μεταγραφή της παραμορφωμένης βάσης και παραμένει στάσιμη στην περιοχή της βλάβης (Svejstrup 2002; Fousteteri et al. 2006; Lainé and Egly 2006). Η αναστολή της RNAPII έχει σαν αποτέλεσμα την άμεση προσέλκυση των UV- stimulated scaffold protein A (UVSSA), της ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP7) και της Cockayne syndrome B πρωτεΐνης (CSB). Η CSB πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την επιστράτευση των NER παραγόντων, τροποποιητών της χρωματίνης, όπως η ακετυλοτρανσφεράση ιστονών p300, καθώς και της Cockayne syndrome A πρωτεΐνης (CSA). Η CSA πρωτεΐνη αποτελεί μέρος του συμπλόκου της E3- λιγάσης της ουμπικουιτίνης Cullin 4A, και είναι απαραίτητη για να επιστρατεύει την High Mobility Group Nucleosome binding 1 (HMGN1), τον παράγοντα ματίσματος του mRNA XAB2 και τον παράγοντα τμήσης TFIIIS. Τέλος, η UV stimulated scaffold protein A (UVSSA) σε σύμπλοκο με την Ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP7) πρωτεάση της ουμπικουιτίνης, προσδένονται στο σύμπλοκο της RNAPII/CSB για να το σταθεροποιήσουν και να επιτρέψουν απομάκρυνση της βλάβης (Schwertman et al. 2012;

Zhang et al. 2012). Η απομάκρυνση του τμήματος DNA που φέρει τη βλάβη και η επανασύνθεση του τμήματος DNA που θα αφαιρεθεί ακολουθεί όπως και στο GG-NER.

Η επιδιόρθωση των βλαβών πραγματοποιείται πιο γρήγορα σε περιοχές του γονιδιώματος που είναι ενεργά μεταγραφόμενες μέσω του TC-NER, σε σχέση με τις περιοχές που δεν μεταγράφονται και εξαρτώνται αποκλειστικά από το GG-NER. Επομένως, η μεταγραφή προστατεύει τη γονιδιακή ακεραιότητα και συνεισφέρει στη μείωση του αριθμού των μεταλλαγών στη μεταγραφόμενη αλυσίδα των ενεργών γονιδίων.



Εικόνα 2 Τα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA με εκτομή νουκλεοτιδίου, (NER). (Kamileri et al., 2012)

Η βιολογική σημασία του TC-NER απεικονίζεται σε άτομα όπου ο μηχανισμός αυτός δεν λειτουργεί. Ο μεγάλος αριθμός βλαβών στο DNA προκαλεί μόνιμη αναστολή της μεταγραφής και κυτταρικό θάνατο είτε μέσω της απόπτωσης ή εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης γονιδίων ζωτικής σημασίας για το κύτταρο με αποτέλεσμα την αστάθεια του γονιδιώματος, εγγενείς παθήσεις και σύνδρομα πρόωρης γήρανσης. Εγγενείς διαταραχές που συνδέονται με ελαττωματικούς NER μηχανισμούς αποτελούν σύνδρομα με πολλαπλές δυσλειτουργίες, όπως η Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma pigmentosum- XP), η

Τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy- TTD) και το Cockayne Syndrome (CS), στο οποίο εστιάζει η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum- XP)

Η Μελαγχρωματική Ξηροδερμία είναι μια σπάνια ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται κατά τα 2 πρώτα χρόνια της ζωής και σχετίζονται με την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από αυξημένη φωτοευαισθησία και αιφνίδια εκδήλωση ερυθήματος, πομφολύγων, υποχρωμικών εξανθημάτων, μελαγχρωματικών κηλίδων και τελαγγειεκτασία. Η νόσος είναι δυνατόν να διαγνωσθεί σε βρεφική ηλικία με κριτήριο την εμφάνιση εφηλίδων και άλλων μελαγχρωματικών βλαβών σε φωτοεκτεθειμένες περιοχές του σώματος (Kraemer et al., 2007). Σε περιπτώσεις που δεν λαμβάνονται μέτρα προφύλαξης από τον ήλιο, οι ασθενείς εμφανίζουν φλόγωση της μεμβράνης των βλεφάρων, κερατίτιδα και τελικά καρκίνο του δέρματος στην πρώτη δεκαετία της ζωής τους. Οι XP ασθενείς παρουσιάζουν 10000 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος και 2000 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μελανώματος πριν την ηλικία των 20 ετών (Kraemer et al., 2007). Όταν το σύνδρομο παρουσιάζεται με τα παραπάνω συμπτώματα σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών Xeroderma Pigmentosum C, E και V (XPC, XPE, XPV), που συμμετέχουν στο GG-NER. Σε ασθενείς που επιπλέον αυτών συνυπάρχουν χαρακτηριστικά νευροεκφυλισμού, απώλειας ακοής, τετραπληγίας κ.α., έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών Xeroderma Pigmentosum A, B, D, F και G (XPA, XPB, XPD, XPF, XPG). Σε αυτές τις περιπτώσεις επηρεάζονται αρνητικά και τα δύο μονοπάτια του NER (TC-NER και GG-NER) (Fassihi et al., 2016; Greenhaw et al., 1992).

Τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy-TTD)

Η Τριχοθειοδυστροφία (Kraemer et al., 2007) αποτελεί σπάνιο νόσημα που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Οφείλεται σε μεταλλάξεις των *TTDA*, *TTDN1*, *XPB* και *XPD* γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Η νόσος χαρακτηρίζεται από ευρύ φάσμα νευρο- εξωδερματικών εκδηλώσεων με κύριο εύρημα τις εύθρυπτες τρίχες που εμφανίζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο ή κυστίνη και χαρακτηριστική εικόνα κατά την εξέταση σε πολωμένο φως. Λόγω της διαταραχής των

μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, οι μισοί περίπου ασθενείς εμφανίζουν φωτοευαισθησία. Επιπρόσθετα συμπτώματα της νόσου αποτελούν η στειρότητα, η νοητική υστέρηση και η μειωμένη ανάπτυξη. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα, λόγω του υψηλού κινδύνου εμφάνισης μαιευτικών και περιγεννητικών επιπλοκών, καθώς και λοιμώξεων (Kleijer et al., 2008).



Εικόνα 3 (DiGiovanna and Kraemer, 2012) Ασθενείς με Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (XP) (a - h) και Τριχοθειοδυστροφία (TTD)(i,j).

Σύνδρομο Cockayne

Το σύνδρομο Cockayne περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Άγγλο φυσικό Edward Alfred Cockayne το 1936. Δέκα χρόνια αργότερα δύο Άγγλοι επιστήμονες, οι Neill και Dingwall παρουσίασαν το περιστατικό δύο αδερφών που έπασχαν από νανισμό, μικροκεφαλία, ενδοκρανιακές αποτιτανώσεις, αμφιβληστροειδοπάθεια και νοητική υστέρηση. Η νόσος που περιέγραψαν αρχικά ονομάστηκε εξ αυτών (Neill-Dingwall) ενώ στη συνέχεια οι ίδιοι πρότειναν ότι επρόκειτο για την ίδια νόσο που είχε χαρακτηριστεί από τον Cockayne. Τη συσχέτισαν επίσης με την πρόωρη γήρανση, καθώς και τα δύο αδέρφια παρουσίαζαν σχετικά χαρακτηριστικά.

Το σύνδρομο Cockayne αποτελεί ένα σπάνιο εκ γενετής σύνδρομο που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη και από νευροεκφυλιστικά προβλήματα. Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η φωτοευαισθησία, η καχεξία, ο νανισμός, ο νευροεκφυλισμός, η κύφωση, η μειωμένη ανάπτυξη του αναπαραγωγικού, η οστεοπόρωση,

και ο πρόωρος θάνατος. Οι ασθενείς με σύνδρομο Cockayne πεθαίνουν στα πρώτα χρόνια της ζωής τους και κατά μέσο όρο σε ηλικία 12 ετών.

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στη Δυτική Ευρώπη υπολογίζεται σε 2.7 ανά εκατομμύριο γεννήσεων (Kubota et al., 2015) και περιορίζεται σε περιορισμένες γεωγραφικές περιοχές στον κόσμο, όπως είναι ο Καναδάς, η Ιαπωνία και κάποιες χώρες της Μέσης Ανατολής (Kleijer et al., 2008).

Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη ετερογένεια συμπτωμάτων. Έχουν καταγραφεί ασθενείς με ήπια συμπτώματα της νόσου με μεγάλη σχετικά διάρκεια ζωής καθώς και περιπτώσεις παιδιών με πολύ σοβαρά συμπτώματα που πεθαίνουν στον πρώτο έως τον τρίτο χρόνο της ζωής τους. Επιπλέον, το σύνδρομο Cockayne έχει συσχετιστεί με μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τη CSB πρωτεΐνη (*ERCC6*) και τη CSA (*ERCC8*). Κατά τη μελέτη του συνδρόμου οι επιστήμονες μπόρεσαν να διακρίνουν τρεις τύπους (Karikkineth et al., 2017): Ο τύπος I αποτελεί την κλασική μορφή του CS (Cockayne Syndrome). Τα νεογνά είναι υγιή και η έναρξη συμπτωμάτων ξεκινά μετά το πρώτο έτος. Ο φαινότυπος έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις στο γονίδιο *ERCC8* (CSA). Στον τύπο II του συνδρόμου τα συμπτώματα είναι φανερά κατά τη γέννηση και ακολουθεί πολύ αργή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Ο τύπος II χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στο *ERCC6* γονίδιο (CSB). Το σύνδρομο COFS (Cerebro Oculo Facio Skeletal Syndrome) θεωρείται μία πολύ σοβαρή μορφή του τύπου II. Τέλος, ο τύπος III περιλαμβάνει τα πιο ήπια περιστατικά, με πολύ μεταγενέστερη έναρξη των συμπτωμάτων.

Ο Wilson και οι συνεργάτες του ανέλυσαν πρόσφατα πάνω από 100 περιστατικά του συνδρόμου και παρουσίασαν μία λεπτομερή κλινική εικόνα της νόσου. Το σύνδρομο είναι δύσκολο ανιχνεύσιμο κατά την κύηση ή και κατά τη γέννηση, παρά τα σοβαρά συμπτώματα και το γενετικό υπόβαθρο. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, τα νεογνά εμφανίζουν φυσιολογικό βάρος και φυσιολογικό κρανίο κατά τη γέννησή τους. Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου είναι το τυπικό παρουσιαστικό του προσώπου που χαρακτηρίζεται από τη μείωση του υποδόριου λίπους, ο αργός ρυθμός ανάπτυξης και η μικροκεφαλία. Οι ασθενείς συχνά πάσχουν από κώφωση, καταρράκτη και φωτοευαισθησία (Wilson et al., 2016). Τυπικό χαρακτηριστικό αποτελεί επίσης η βλάβη του νευρικού συστήματος που επιβεβαιώθηκε με απεικονιστικές μεθόδους και περιλαμβάνει αποτιτανώσεις, μείωση του αριθμού των νευρώνων, απομυελινωτική περιφερική νευροπάθεια και αγγειοπάθεια. Τα παραπάνω έχουν ως συνέπειες τη μικροκεφαλία, νοητική υστέρηση με χαμηλό δείκτη IQ, τρόμο, αταξία, επιληπτικές κρίσεις, εγκεφαλικά επεισόδια και εγκεφαλική αιμορραγία (Karikkineth et al., 2017).

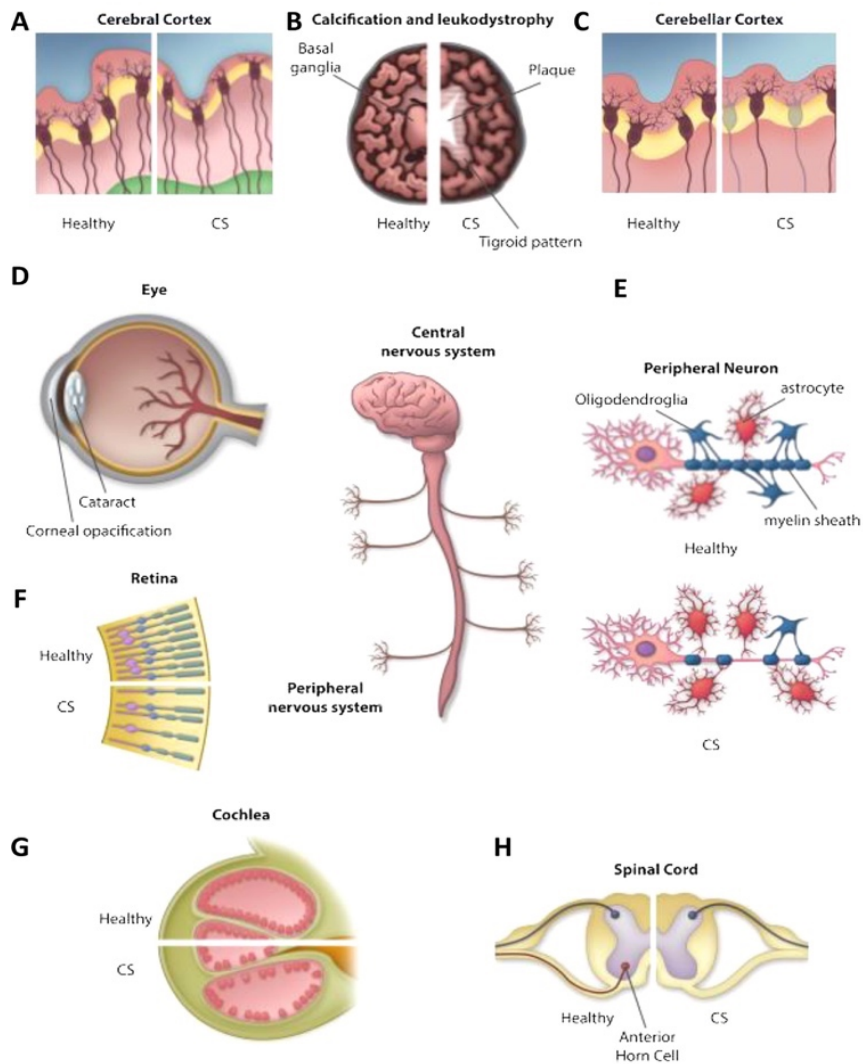
Σε κυτταρικό επίπεδο, τα κύτταρα CS ασθενών πολλαπλασιάζονται αργά και παρουσιάζουν υπερευαισθησία σε διαφορετικούς τύπους βλαβών στο DNA, όπως η UV ακτινοβολία, το οξειδωτικό στρες, και τα double strand breaks (DSB) (Moriwaki, 2013) . Επίσης, χαρακτηρίζονται από γενική αναστολή της μεταγραφής μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.



Εικόνα 4 Σταδιακή απώλεια του υποδόριου λίπους του προσώπου που οδηγεί σε βυθισμένα μάτια και στο χαρακτηριστικό ρυτιδωμένο πρόσωπο (Karikkineth et al., 2017; Wilson et al., 2016)

Διάγνωση

Τα κριτήρια διάγνωσης καθιερώθηκαν το 1992 και από τότε παραμένουν τα ίδια σε μεγάλο ποσοστό. Βασικό διαγνωστικό κριτήριο είναι η μειωμένη σωματική ανάπτυξη η οποία επιτελείται με πολύ αργούς ρυθμούς. Ακολουθούν πέντε κριτήρια τα οποία απαιτούνται ώστε να επιβεβαιωθεί η αρχική διάγνωση. Αυτά είναι η φωτοευαισθησία, ο καταρράκτης, η αισθητηριακή απώλεια ακοής, η φθορά των δοντιών και ο καχεκτικός νανισμός (Nance and Berry, 1992). Σε μοριακό επίπεδο εφαρμόζονται ειδικές μετρήσεις του ρυθμού επιδιόρθωσης του DNA μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς επίσης είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση του γενωμικού DNA (Marteijn et al., 2014; Zhang et al., 2012)



Εικόνα 5 (Karikkineth et al., 2017) Κάποια από τα σημαντικότερα κλινικά χαρακτηριστικά του CS, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικού ατόμου. A: ο εγκεφαλικός φλοιός μπορεί να είναι ελαφρώς λεπτότερος, με σχετική διατήρηση των νευρών. B: Αλλαγές στη λευκή ουσία: εικόνα «τιγροειδής λευκοδυστροφία», με περιοχές περισσότερο επηρεασμένες να εναλλάσσονται με κάποιες λιγότερο, δημιουργώντας ένα μοτίβο που θυμίζει λωρίδες της τίγρης. C: Παρεγκεφαλίδα: Απουσία των Purkinje κυττάρων. D: Οφθαλμός: Παρουσία καταρράκτη και αδιαφανής κερατοειδούς χιτώνας στους CS ασθενείς. E: Νευρώνες: Λιγότερα ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendroglia), μειωμένη παραγωγή μυελίνης (myelin sheath) που οδηγεί στην απομυελινωτική νευροπάθεια. Αυξημένος αριθμός αστροκυττάρων (astrocytes) εντοπίζονται σε περιοχές με μυελίνη και με λιγότερα ολιγοδενδροκύτταρα. F: Αμφιβληστροειδής χιτώνας με μειωμένα ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα που αποτελούν υποδοχείς του φωτός. G: Κοχλίας: Λιγότερα τριχωτά κύτταρα. H: Νωτιαίος μυελός: πιθανό να απουσιάζουν κύτταρα του πρόσθιου τμήματος της φαιάς ουσίας (anterior horn cells), χωρίς να είναι γνωστό αν αυτό αποτελεί πρωτογενές ή δευτερογενές χαρακτηριστικό.

Θεραπεία

Δεν υπάρχει θεραπεία για το σύνδρομο. Η αγωγή είναι κυρίως συμπτωματική και ο σκοπός της είναι να αναστείλει σε ένα ποσοστό την πρόοδο των κλινικών συμπτωμάτων και να βελτιώσει την ποιότητα ζωής των ασθενών. Για έγκαιρη διάγνωση των επιπλοκών που σχετίζονται με τη νόσο προτείνεται εξειδικευμένο προσωπικό για τη θεραπευτική αγωγή. Συστήνεται η λήψη αντιοξειδωτικών (βιταμίνη C, βιταμίνη E και κατεχίνες), διέγερση του νου,

ενθάρρυνση κίνησης και φυσικοθεραπείες καθώς είναι πολύ σημαντικό να ανασταλεί κατά το εφικτό η ανάπτυξη των νευρολογικών ανωμαλιών (Moriwaki, 2013).

Πρόσφατες έρευνες έχουν προτείνει θεραπευτική αγωγή που θα μπορούσε να χορηγηθεί στο μέλλον. Παράδειγμα αποτελούν ο Chatre και οι συνεργάτες του οι οποίοι πρόσφατα παρατήρησαν ότι η CSB απορρυθμίζει την έκφραση μίας πρωτεΐνης της σερίνης η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της μιτοχονδριακής πολυμεράσης γ, παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων. Η αναστολή της πρωτεΐνης της σερίνης *in vitro* επαναφέρει τη φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων. Κατά συνέπεια, χορήγηση του αναστολέα της πρωτεΐνης σε CS ασθενείς, είναι πιθανόν να μειώνει τον ρυθμό γήρανσης (Chatre et al., 2015).

Μοριακό προφίλ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, υπεύθυνες για το σύνδρομο είναι είτε η CSA είτε η CSB πρωτεΐνες και η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει μεταλλάξεις στο *ERCC6* γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για τη CSB πρωτεΐνη (Laugel et al., 2010). Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αυτές έχουν βρεθεί στους ασθενείς, ωστόσο δεν ήταν δυνατόν να συσχετισθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις με συγκεκριμένους φαινοτύπους. Το παραπάνω μαζί με το γεγονός ότι οι βλάβες στο μονοπάτι του TC-NER δεν μπορούν να εξηγήσουν εξ ολοκλήρου την ετερογένεια των ασθενών και την ιστο-ειδικότητα των παθολογικών χαρακτηριστικών καθώς και το ότι η συσσώρευση γενετικών βλαβών μετά από έκθεση σε τοξικούς παράγοντες δεν μπορεί να δικαιολογήσει επαρκώς τις αναπτυξιακές ανωμαλίες και την πρόωρη γήρανση των νεογνών που πάσχουν από CS, εισήγαγαν την υπόθεση ότι οι CS πρωτεΐνες έχουν και άλλους ρόλους εκτός από αυτόν στο TC-NER (Kamileri et al., 2012)

Η πρωτεΐνη CSB

Η πρωτεΐνη CSB είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q11.23, το οποίο κλωνοποιήθηκε πρώτη φορά το 1992. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 1493 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 168 kDa. Αρχικά χαρακτηρίστηκε για τον ρόλο της στο TC-NER μονοπάτι (Troelstra et al., 1992). Είναι μέλος της οικογένειας SWI2/SNF2 πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να αναδιοργανώνουν τη χρωματίνη και έχουν δράση ATPάσης. Περιέχει ένα πολύ συντηρημένο μοτίβο ελικάσης, ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία για τη δράση ελικάσης. Στο αμινοτελικό άκρο της εντοπίζεται

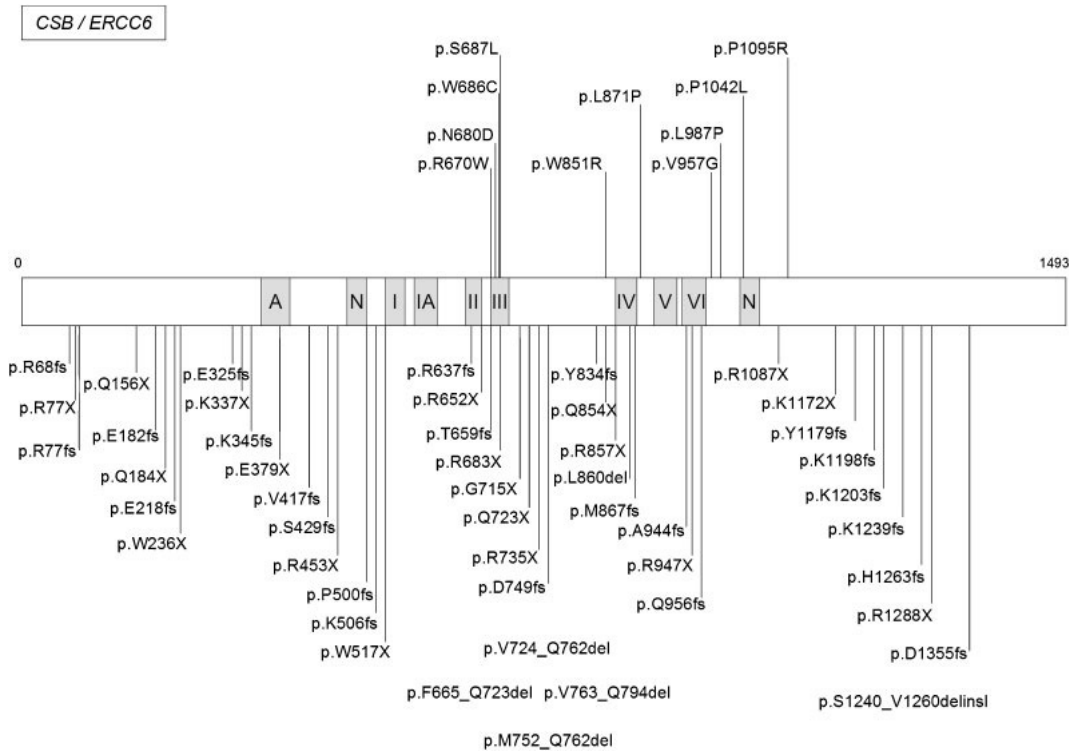
μία περιοχή πλούσια σε όξινα αμινοξέα, της οποίας η λειτουργία δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Brosh et al., 1999; Troelstra et al., 1992). Στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται μία περιοχή που συνδέεται με ουμπικουιλίνη (Anindya et al., 2010) ενώ στο κέντρο μία περιοχή με δράση ATPάσης. Η πρωτεΐνη περιέχει επίσης δύο περιοχές με αλληλουχίες πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Localization Sequences - NLS). Έχει προταθεί ότι η CSB έχει την ικανότητα αυτορρύθμισης. Συγκεκριμένα το καρβοξυτελικό άκρο της και η κεντρική περιοχή με τη δράση ATPάσης έχουν την ικανότητα σύνδεσης με τη χρωματίνη. Το αμινοτελικό άκρο, παρότι δεν συνδέεται, ελέγχει την ειδικότητα δέσμευσης του καρβοξυτελικού και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σύνδεσης υπό φυσιολογικές συνθήκες. (Lake et al., 2010)

Σε κάποιες περιπτώσεις φυσιολογικών αλλά και CS κυττάρων, εξαιτίας εναλλακτικού ματίσματος, εκφράζεται μία πρωτεΐνη σύντηξης της CSB και της PiggyBac. Αυτή προκύπτει από την μεταγραφή των ERCC6-PGBD3 και έχει μοριακό βάρος 120kDa. Περιέχει 465 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της CSB, τα οποία ακολουθεί η PiggyBac. Διαθέτει δηλαδή την περιοχή με τα όξινα αμινοξέα, καθώς και την κεντρική περιοχή με δράση ATPάσης, αλλά στερείται των μοτίβων ελικάσης. Ο ρόλος της πρωτεΐνης σύντηξης δεν έχει αποσαφηνιστεί, με κάποιες μελέτες να παρουσιάζουν στοιχεία εμπλοκής της στον φαινότυπο των CS ασθενών. Ωστόσο η υπόθεση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί.

Η CSB βρίσκεται μεταλλαγμένη στο 70% των περιπτώσεων με Cockayne Syndrome. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πολλά είδη μεταλλαγών και σε πολλά διαφορετικά σημεία της πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι παρανοηματικές, αφαίρεσης ή αντικατάστασης νουκλεοτιδίου, μη νοηματικές και μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου. (Laugel et al., 2010).

CS1AN μετάλλαξη

Η κυτταρική σειρά CS1AN περιγράφηκε από τους Troelstra et al. το 1992. Στο αλληλόμορφο β του γονιδίου, μία αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη στο νουκλεοτίδιο 2648, οδηγεί σε εσφαλμένο εναλλακτικό μάτισμα που καταλήγει σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης. Διαγράφονται τουλάχιστον 100 ζ.β του εξωνίου 13, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας μη λειτουργικής πρωτεΐνης.



Εικόνα 6 Χάρτης των μεταλλαγών του γονιδίου CSB/ERCC6. Οι παρανοηματικές μεταλλάξεις σημειώνονται στο πάνω μέρος της πρωτεΐνης, ενώ στο κάτω μέρος οι μεταλλάξεις αφαίρεσης ή αντικατάστασης νουκλεοτιδίου. Τα μοτίβα ελικάσης (I έως VI), η υπομονάδα πλούσια σε όξινα αμινοξέα (A) και η αλληλουχία πυρηνικής εντόπισης (N- Nuclear localization sequence). (Laugel et al., 2010)

Ο ρόλος της CSB πρωτεΐνης

Η CSB πρωτεΐνη συμμετέχει σε πολλούς μεταβολικούς μηχανισμούς του DNA, όπως η επιδιόρθωση και η μεταγραφή.

Ο ρόλος της στο TC-NER μονοπάτι είναι πλέον επιβεβαιωμένος. Έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνη για την επιστράτευση των πρωτεϊνών του TC-NER συμπλόκου στην RNA πολυμεράση που βρίσκεται σταματημένη στο σημείο της βλάβης του DNA και αλληλοεπιδρά απευθείας με την RNA πολυμεράση (Bradsher et al., 2002; Fousteri et al., 2006; van Gool et al., 1997; Sarker et al., 2005; Tantini et al., 1997; Yuan et al., 2007).

Η διπλή έλικα είναι απαραίτητο να αποδιαταχθεί προκειμένου να εντοπιστεί μία βλάβη και να επιδιορθωθεί. Αυτό είναι δυνατόν να συμβεί είτε μέσω τροποποιήσεων των ιστονών, είτε με αφαίρεση κάποιων ιστονών ή και ολόκληρων νουκλεοσωμάτων. Οι SWI/SNF2 πρωτεΐνες, στις οποίες ανήκει η CSB, αναδιοργανώνουν τη χρωματίνη μέσω της δράσης ATPάσης (Kingston and Narlikar, 1999). Η δράση της CSB στην αναδιοργάνωση του DNA έχει μελετηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες (Beerens et al., 2005; Christiansen, 2003;

Citterio et al., 2000; Newman et al., 2006). Η CSB φέρεται να αλληλοεπιδρά, άμεσα ή μέσω κοινού συμπλόκου, και με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες που έχουν την ιδιότητα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Παράδειγμα αποτελούν ιστόνες (Citterio et al., 2000), ο μεταφραφικός παράγοντας λήξης 1 (Transcription Termination Factor 1-TTF1) (Strohner et al., 2001; Yuan et al., 2007), η G9α μεθυλοτρανσφεράση (Yuan et al., 2007) και το σύμπλοκο NuRD (Nucleosome remodeling and deacetylation complex), που αναδιοργανώνει τη χρωματίνη μέσω δράσης ATPάσης και κατέχει δράση αποακετυλίωσης ιστονών. (Xie et al., 2012). Τέλος αλληλεπιδρά μάλλον έμμεσα με την p300, την HMGN1 και την XPA binding protein 2 (XAB2), των οποίων η απόκριση φαίνεται πως εξαρτάται από αυτή (Nakatsu et al., 2000).

Στοιχεία επίσης υπάρχουν για τον ρόλο της στην επιδιόρθωση οξειδωτικών τροποποιήσεων κατά την επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair -BER), καθώς έχει βρεθεί να αλληλοεπιδρά με ένζυμα που συμμετέχουν στον μηχανισμό. (Aamann et al., 2013; Licht et al., 2003). Τα μοτίβα V και VI συμμετέχουν τόσο στο TC-NER όσο και στο BER, ενώ το μοτίβο II μόνο στο TC-NER. Η ανεξάρτητη δράση της ATPάσης σχετίζεται με τη δράση της πρωτεΐνης στο TC-NER και με την ικανότητα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (Citterio et al., 2000; Selby and Sancar, 1997) και όχι με το BER μονοπάτι. (Muftuoglu, 2006). Πράγματι, εκτός από την υπερευαισθησία στη UV ακτινοβολία, τα CS κύτταρα παρουσιάζουν επίσης ευαισθησία σε πολλούς μεταλλαξογόνους παράγοντες που προκαλούν βλάβες που επιδιορθώνονται μέσω του BER, συμπεριλαμβανομένης και της ιονίζουσας ακτινοβολίας (IR) και της καμπτοθεκίνης.

Η CSB πρωτεΐνη ρυθμίζει την επιμήκυνση της μεταγραφής μέσω της μιτοχονδριακής πολυμεράσης I (mtRNApolI). Παρότι ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι η CSB πρωτεΐνη διευκολύνει τη μεταγραφή αφαιρώντας πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στη μεταγραφόμενη αλυσίδα μπροστά από το σύμπλοκο της μεταγραφής (Scheibye-Knudsen et al., 2012). Επίσης, εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του μιτοχονδριακού DNA, ρυθμίζοντας την επιστράτευση και τη λειτουργία πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο BER μονοπάτι, στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Aamann et al., 2010).

Επιπλέον η CSB σταθεροποιεί τη σύνδεση της p53 με τη χρωματίνη και συμβάλλει στην ουμπικουιλίνωση της ίδιας πρωτεΐνης (Lake et al., 2010; Latini et al., 2011). Τέλος διαθέτει την ικανότητα να υβριδοποιεί μονόκλιωνα τμήματα DNA και κατέχει ρόλο στον επιχιασμό. Η δράση της αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την δράση της ATPάσης (Muftuoglu, 2006).

CSA πρωτεΐνη

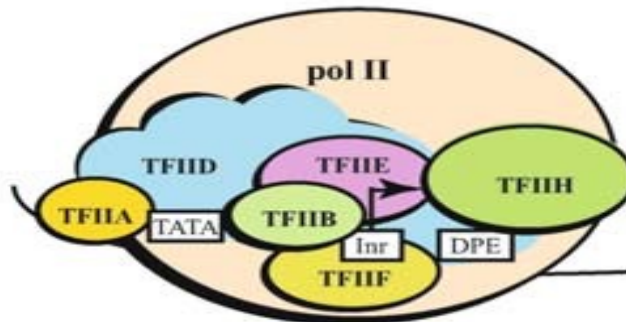
Το γονίδιο *ERCC8* που κωδικοποιεί για τη CSA πρωτεΐνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q12.1 και αποτελείται από 12 εξώνια. Η CSA έχει μοριακό βάρος 44kDa και αποτελείται από επτά επαναλαμβανόμενα μοτίβα WD40 αλληλουχιών. Στο αμινοτελικό της άκρο εντοπίζεται το διπεπτίδιο Gly-His και στο καρβοξυτελικό της άκρο το διπεπτίδιο Trp- Asp. Αυτά τα μοτίβα (που διαθέτουν δομή β-propeller) διευκολύνουν την αλληλεπίδραση της CSA με άλλες πρωτεΐνες, όπως η CSB και η DNA damage-binding protein 1 (DDB1). Πέραν του ρόλου της στο TC-NER, ο οποίος περιεγράφηκε παραπάνω, η CSA φέρεται να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας της RNAPI στον πυρήνα (Bukowska and Karwowski, 2018).

Οι μεταλλαγές που έχουν χαρακτηριστεί στο γονίδιο και προκαλούν το σύνδρομο Cockayne εντοπίζονται στα WD μοτίβα, υποδηλώνοντας τον ρόλο αυτής της περιοχής στη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Η CSA, σε σύμπλοκο με τη DDB1 πρωτεΐνη, την Cullin4a και τις RING-box 1 (RBX1) πρωτεΐνες, αποτελεί μέρος μίας E3 λιγάσης της ουμπικουιτίνης (E3 ubiquitin ligase) και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των πρωτεϊνικών στόχων στις οποίες θα προστεθούν ομάδες ουμπικουιτίνης, προκειμένου να αποικοδομηθούν (Groisman et al., 2003).

ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Έναρξη

Το πρώτο βήμα στη γονιδιακή έκφραση είναι ο σχηματισμός του προ-εναρκτήριου συμπλόκου (Pre-Initiation Complex-PIC) στον υποκινητή του εκφραζόμενου γονιδίου (Levine, 2011; Sikorski and Buratowski, 2009; Thomas and Chiang, 2006). Συνοπτικά, ο μεταγραφικός παράγοντας TFIID αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες στην περιοχή του υποκινητή (όπως η TATA αλληλουχία και οι περιοχές DPE- Downstream Promoter Elements) και προσδένεται σε αυτές. Στη συνέχεια, προσελκύονται οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες TFIIA, TFIIB, και ο TFIIF μαζί με την RNAPII. Αυτό το σύμπλεγμα αρχικά δεν είναι σταθερό, καθώς η διπλή έλικα στην περιοχή των υποκινητών είναι κλειστή. Ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIF, ο οποίος περιέχει ATP- εξαρτώμενες πρωτεϊνικές υπομονάδες με δράση ελικάσης τροποποιεί το DNA, αποδιάτασσοντας τη διπλή έλικα στην περιοχή των υποκινητών. Στο σημείο αποδιάταξης του DNA δημιουργείται η φυσαλίδα μεταγραφής και το παραπάνω σύμπλεγμα σταθεροποιείται.



Εικόνα 7 (Thomas and Chiang, 2006) Το προ-εναρκτήριο σύμπλοκο αποτελείται από τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση II. Σχηματίζεται σε ειδικές αλληλουχίες του υποκινητή και η σταθεροποίησή του εξαρτάται από τον TFIIF.

Σε αυτό το σημείο η RNAPII ξεκινά τη σύνθεση του mRNA από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (+1, Transcription Start Site- TSS). Αρχικά η σύνθεση είναι αργή και μη αποδοτική, με αποτέλεσμα να παράγονται μικρά μόρια RNA, μικρότερα των 10 ριβονουκλεοτιδίων, που τελικά αποβάλλονται. Το αν θα προχωρήσει η RNA πολυμεράση στο κύριο μέρος του γονιδίου (promoter escape) εξαρτάται από τον TFIIF και από άλλους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το σύμπλεγμα Mediator (Boeing et al., 2010; Hirose and Ohkuma, 2007; Levine, 2011). Συγκεκριμένα η κινάση Cdk7, που περιλαμβάνεται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο του TFIIF, φωσφορυλιώνει τη σερίνη5 μίας αλληλουχίας επτά πεπτιδίων που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της μεγάλης υπομονάδας της RNAPII. Μόνο έπειτα από αυτή τη φωσφορυλίωση η πολυμεράση είναι ικανή να αποδράσει από τον υποκινητή και να παράξει ένα ακέραιο μόριο mRNA (Levine, 2011).

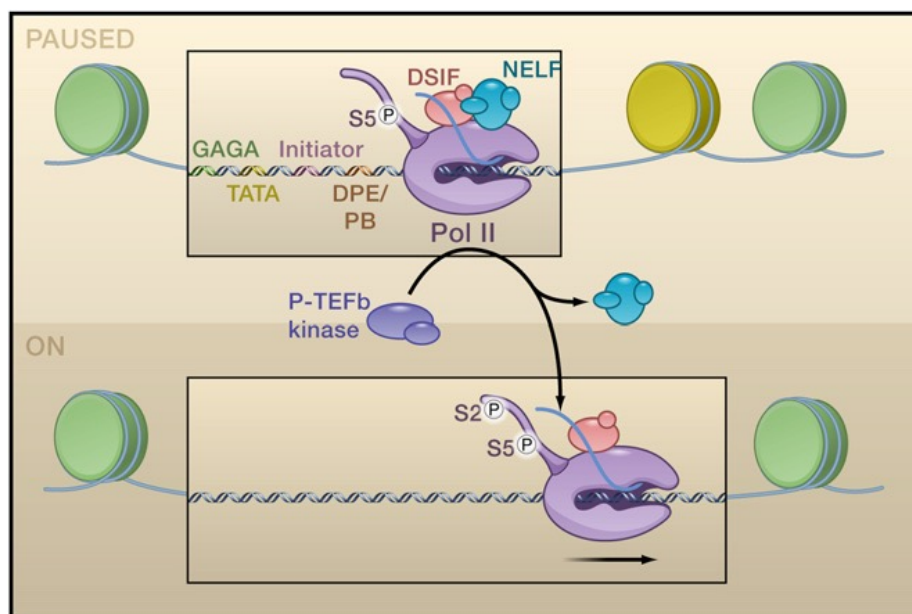
Στη συνέχεια, όταν η πολυμεράση φτάσει στα +30 έως στα +50 νουκλεοτίδια από το TSS, σταματά συχνά σε περιοχές που ονομάζονται θέσεις παύσης της μεταγραφής πλησίον των υποκινητών (Proximal Promoter Pausing Sites, PPP) (Gilmour and Fan, 2009). Αυτή η παύση της πολυμεράσης πραγματοποιείται από τους παράγοντες DSIF (DRB Sensitivity-Inducing Factor) και τον αρνητικό παράγοντα επιμήκυνσης (Negative Elongation Factor- NELF), οι οποίοι προσδένονται στο νεοσυντιθέμενο μόριο RNA και δεν επιτρέπουν τη περαιτέρω πορεία της πολυμεράσης. Η δέσμευση και αποδέσμευση της RNA πολυμεράσης από τις PPP περιοχές θεωρείται βασικός τρόπος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης ενός κυττάρου και είναι ζωτικής σημασίας κατά την ανάπτυξη (Levine, 2011).

Επιμήκυνση

Η επιμήκυνση της μεταγραφής ξεκινά από την απελευθέρωση της RNA πολυμεράσης II από το PPP και εξαρτάται από διάφορα αναπτυξιακά ή περιβαλλοντικά σήματα.

Ο P-TEFb επιστρατεύεται στις PPP περιοχές των γονιδίων. Το σύμπλοκο του Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb) αποτελείται από την κινάση Cdk9 και τη ρυθμιστική της πρωτεΐνη, κυκλίνη T. Η κινάση Cdk9 φωσφορυλιώνει το καρβοξυτελικό άκρο της μεγαλύτερης υπομονάδας του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II, RBP1 και συγκεκριμένα τη σερίνη 2 της αλληλουχίας των επτά πεπτιδίων (Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7), η οποία επαναλαμβάνεται 52 φορές στον άνθρωπο (περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω). Η φωσφορυλιωμένη στη Ser2 RNAPII (RNAPII-Ser2P), αποτελεί την πολυμεράση επιμήκυνσης.

Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση της RNAPII πάνω στα γονίδια και την παραγωγική μεταγραφή (Sainsbury et al., 2015)(Lavigne et al., 2017).



Εικόνα 8 (Levine, 2011) Η σταματημένη RNA πολυμεράση II και η αποδέσμευσή της από το PPP. Στην “paused” κατάσταση η πολυμεράση έχει αποδράσει από τον υποκινητή και είναι φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 5 του καρβοξυτελικού της άκρου. Οι παράγοντες DSIF και NELF συμβάλλουν στην παύση της πολυμεράσης, καθώς προσδένονται στο νεοσυντιθέν τμήμα του mRNA. Η δράση του P-TEFb προκαλεί την απομάκρυνση του NELF και τη φωσφορυλίωση της σερίνης 2 του καρβοξυτελικού της άκρου της πολυμεράσης. Με αυτόν τον τρόπο επέρχεται η “on” κατάσταση στην οποία η πολυμεράση προχωρά στο κύριο μέρος του γονιδίου.

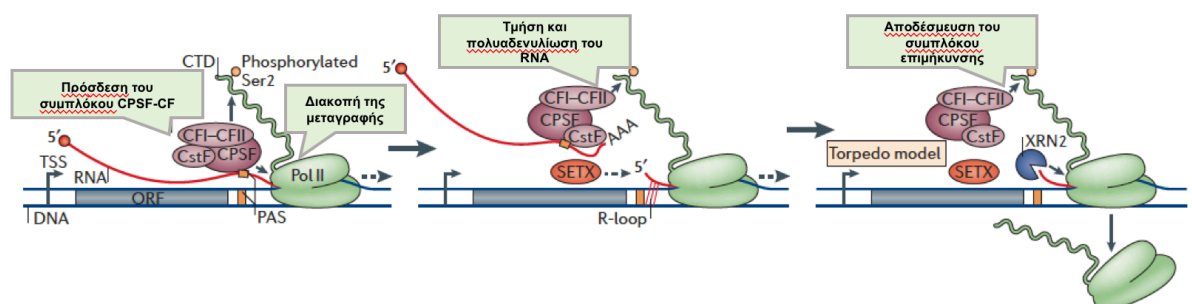
Τερματισμός

Η RNAPII αντιλαμβάνεται απευθείας μία ενεργή PAS (Poly (A) Site) περιοχή του γονιδίου κατά το πέρασμά της από αυτή (Proudfoot, 2016). Ως συνέπεια, ακολουθεί πρόσδεση των Cleavage and PolyAdenylation (CPA) παραγόντων στο νεοσυντιθέμενο μόριο

RNA, αλλά και στην ίδια την πολυμεράση, με αποτέλεσμα την τμήση και την πολυαδενυλίωση του RNA. Οι υπεύθυνοι CPA παράγοντες είναι οι: Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor (CPSF), Cleavage stimulatory Factor (CstF), Cleavage Factor I (CFI) και Cleavage Factor II (CFII). Ο CPSF προσδέεται άμεσα με το μόριο της RNAPII, ενώ οι CstF, CFI και CFII προσδέονται στη φωσφορυλιωμένη σερίνη 2 της RNAPII. Επιπλέον, οι CPSF και CstF αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοτίβα στο 3' άκρο του νεοσυντιθέμενου RNA. Εξαιτίας αυτών των αλληλεπιδράσεων η μεταγραφή επιβραδύνεται και διακόπτεται (transcription pausing).

Ακολουθεί τμήση και πολυαδενυλίωση του RNA στο 3' τελικό άκρο, που διευκολύνουν την έξοδό του από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα και την επικείμενη μετάφραση.

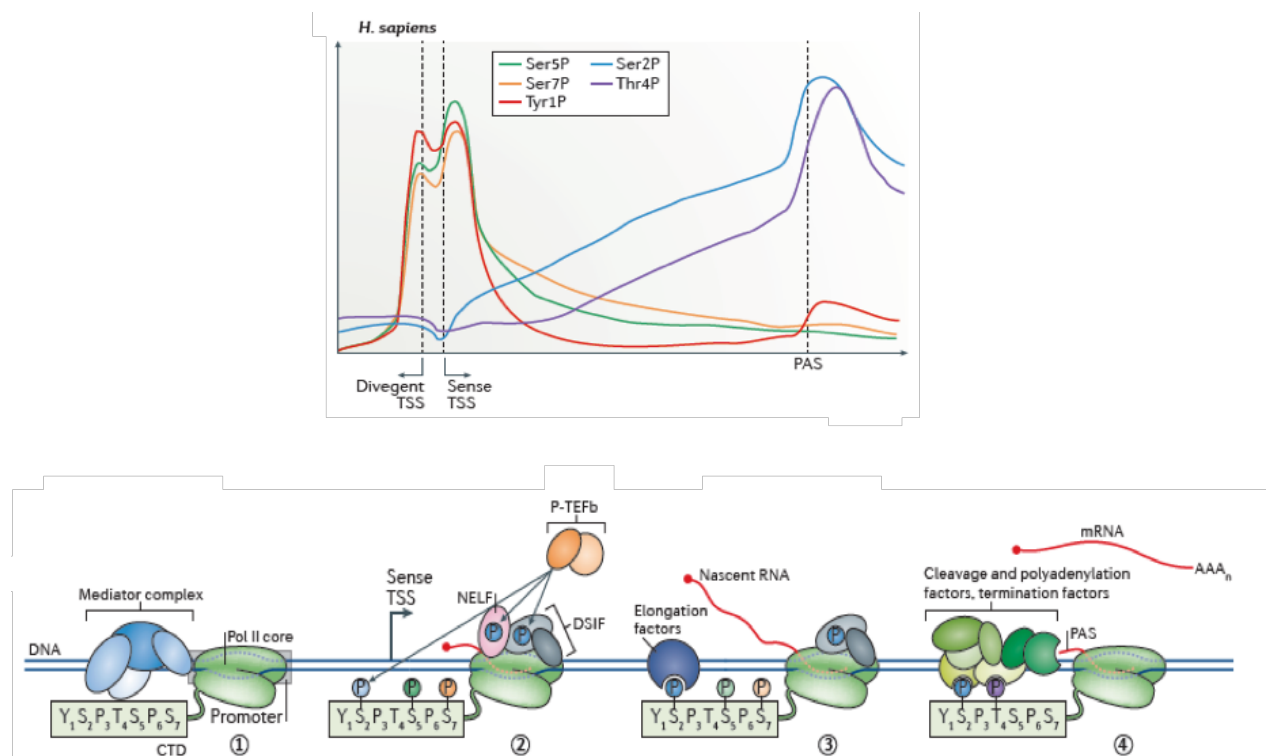
Η setaxin (SETX) φέρεται να συμμετέχει στον τερματισμό της μεταγραφής κάποιων γονιδίων πιθανώς αποδιοργανώνοντας τις R-θηλιές (R-loops), ώστε να επιτραπεί η είσοδος της 5'-3' εξωριβονουκλεάσης XRN2. Η αποικοδόμηση του 3' τμήματος του νεοσυντιθέμενου RNA από την XRN2 θεωρείται ότι καταλήγει στον τερματισμό της μεταγραφής (μοντέλο torpedo) (Porrua and Libri, 2015).



Εικόνα 9 τροποποιημένη από (Porrua and Libri, 2015) Τερματισμός της μεταγραφής στα γονίδια που κωδικοποιούν mRNA, όπως περιγράφεται στο κείμενο.

Οι διαφορετικές ισομορφές της RNA πολυμεράσης II

Το καρβοξυτελικό τμήμα (carboxy-terminal domain -CTD) της μεγαλύτερης πρωτεϊνικής υπομονάδας RPB1 της RNAPII εντοπίζεται αποκλειστικά στην ευκαρυωτική RNA πολυμεράση II και αποτελείται από διαδοχικές επαναλήψεις του επταπεπτιδίου Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (26 επαναλήψεις στη ζύμη και 52 στον άνθρωπο). Το CTD λειτουργεί ως πλατφόρμα πρόσδεσης πολλών παραγόντων που εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της μεταγραφής και άλλων σχετιζόμενων με τη μεταγραφή διαδικασιών, όπως η προσθήκη καλύμματος και το μάτισμα του mRNA. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το CTD υφίσταται μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις σε όλη τη διάρκεια του κύκλου της μεταγραφής. Συγκεκριμένα τα αμινοξέα Tyr1, Ser2, Ser5, Ser7 and Thr4 φωσφορυλιώνονται προκειμένου να προχωρήσει η μεταγραφή.



Εικόνα 10 τροποποιημένη από (Harlen and Churchman, 2017) Οι διαφορετικές ισομορφές της RNAPII κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων της μεταγραφής.

Υπόθεση

Σε αντίθεση με άλλες ασθένειες που σχετίζονται κυρίως με ελλιπή επιδιόρθωση του DNA, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι βλάβες στο μονοπάτι του TC-NER δεν μπορούν να εξηγήσουν εξ ολοκλήρου την ετερογένεια των ασθενών και την ιστο-ειδικότητα των παθολογικών χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση γενετικών βλαβών μετά από έκθεση σε τοξικούς παράγοντες δεν μπορεί να δικαιολογήσει επαρκώς τις αναπτυξιακές ανωμαλίες και την πρόωρη γήρανση των νεογνών που πάσχουν από CS. Επιπρόσθετα, η συστηματική μελέτη μεταγραφικών δικτύων και μονοπατιών, καθώς και η χρήση μοντέλων CS ποντικών και κυττάρων ασθενών, μέχρι στιγμής δεν έχει καταλήξει σε σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με τη δράση της CSB. Οι νευρολογικές δε ανωμαλίες διαφέρουν ανάμεσα στους CS και XP ασθενείς, γεγονός που προτείνει διαφορετικούς μηχανισμούς στη νευροπαθολογία του Cockayne Syndrome.

Βασιζόμενες στη στενή σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών RNAPII και CSB, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν προτείνει έναν πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης CSB στη ρύθμιση της μεταγραφής (Balajee et al., 1997; van den Boom et al., 2004; Dianov et al., 1997; Selby and Sancar, 1997; Tantin et al., 1997), παρόμοια με άλλες πρωτεΐνες όπως ο TFIIH που παίζει κύριο ρόλο στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA και κατέχει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή ως βασικός μεταγραφικός παράγοντας (Compe and Egly, 2012).

Άλλο ένα στοιχείο που ενισχύει αυτή την υπόθεση είναι ότι ο ίδιος ο φαινότυπος του συνδρόμου Cockayne, εμφανίζει ομοιότητες με την Τριχοθειοδυστροφία (TTD), η οποία χαρακτηρίζεται ως σύνδρομο μεταγραφής. Τέλος, η πρωτεΐνη CSB έχει συσχετισθεί με τη ρύθμιση της μεταγραφής μετά από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, μαζί με την p53 πρωτεΐνη (Lake et al., 2010, 2011; Proietti-De-Santis et al., 2006).

Αρχικές μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο της Δρ. Μ. Φουστέρη δείχνουν ότι οι CS πρωτεΐνες, εκτός από τη στρατολόγησή τους σε περιοχές με βλάβες που επιδιορθώνονται μέσω TC-NER, προσδένονται και σε περιοχές που βρίσκονται κοντά στις περιοχές έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων και μάλιστα σε συγκεκριμένες θέσεις πριν αλλά και μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, οι οποίες δε φαίνεται να σχετίζονται με την ύπαρξη βλαβών, αλλά πιθανά αποτελούν περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ασθενών με CS είναι η ατροφία της παρεγκεφαλίδας (cerebellum) και η απώλεια νευρικών κυττάρων και συγκεκριμένα των κυττάρων Parkinje (Εικόνα 5). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δέσμευση των CS πρωτεϊνών στις συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος δείχνει ότι οι CS πρωτεΐνες πιθανά να έχουν έναν άγνωστο μέχρι τώρα ρόλο στη γονιδιακή

ρύθμιση. Σύμφωνα με την υπόθεση της παρούσας μελέτης, οι CS πρωτεΐνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης ελέγχοντας την επιμήκυνση της μεταγραφής από την RNAPII σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Αυτές πιθανόν να είναι περιοχές που είναι δύσκολο να μεταγραφούν ή στις οποίες υπάρχει αναστολή της RNAPII (transcriptional arrest).

Αυτή η υπόθεση σε συνδυασμό με την επίδραση μεγάλου βαθμού οξειδωτικού στρες στους νευρώνες κατά τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια, θα μπορούσε να εξηγήσει την απώλεια νευρικών κυττάρων, τον εκφυλισμό του αμφιβληστροειδούς χιτώνα και τις αναπτυξιακές ανωμαλίες που παρατηρούνται σε ασθενείς με σύνδρομο Cockayne, οι οποίες τελικά μπορεί να οφείλονται σε ελαττωματική γονιδιακή ρύθμιση. Ο ρόλος που πιθανά έχουν οι CS πρωτεΐνες στη ρύθμιση της μεταγραφής μπορεί να ανοίξει νέους ορίζοντες στην κατανόηση της μοριακής βάσης της παθογένειας του ασθενούς αυτής.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της CSB πρωτεΐνης στη μεταγραφή, μελετήθηκε η απόκριση των μοριακών μηχανισμών της μεταγραφής έπειτα από την επίδραση γενετοξικών παραγόντων αρχικά σε φυσιολογικά κύτταρα και στη συνέχεια σε κύτταρα Cockayne ασθενών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διατήρηση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της παρούσας διατριβής ήταν VH10 και VH25 hTERT αθανατοποιημένοι φυσιολογικοί ινοβλάστες δέρματος (Tresini et al., 2015), CS1AN hTERT αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος από ασθενείς με σύνδρομο CS, με μη λειτουργική CSB πρωτεΐνη, καθώς και CSA hTERT αθανατοποιημένοι ινοβλάστες, με μη λειτουργική CSA πρωτεΐνη. Όλες οι κυτταρικές σειρές, αρνητικές για μυκόπλασμα (Jena Bioscience), καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Scientific) εμπλουτισμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS, Thermo Scientific) (10% v/v) και πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Thermo Scientific) (1% v/v). Για τα VH10, χρησιμοποιήθηκε 25 µg/ml G418 (Applichem) αντιβιοτικό επιλογής του κλώνου και για τα CS1AN 25 µg/ml puromycine (Thermo Scientific). Τα κύτταρα, διατηρήθηκαν σε φλάσκες με επιφάνεια 175 τ.εκ., μέσα σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) 5%.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, όλα τα στάδια της οποίας πραγματοποιήθηκαν μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow):

Αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 10 ml PBS 1x. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3ml διαλύματος τρυψίνης – EDTA (Thermo Scientific) και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 3 περίπου λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από την επιφάνεια των φλασκών όπου βρίσκονταν προσκολλημένα. Τέλος προστέθηκαν 7 ml θρεπτικού υλικού DMEM για την απενεργοποίηση της τρυψίνης και τα κύτταρα αναμείχθηκαν προσεκτικά μέχρι να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα και να «σπάσουν» τυχόν συσσωματώματα. Ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες το κυτταρικό εναιώρημα μοιράστηκε σε νέες φλάσκες ή τρυβλία, και συμπληρώθηκε η κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού.

Κατάψυξη και απόψυξη κυτταρικών σειρών

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

Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon 15 ml και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο

απομακρύνθηκε και στη συνέχεια το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε θρεπτικό υλικό κατάψυξης (freezing medium) το οποίο περιέχει (90% v/v FBS και 10% DMSO). Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικά φιαλίδια ψύξης (cryotubes). Αυτά τοποθετήθηκαν αμέσως σε πάγο και έπειτα σε καταψύκτη -80°C, απ' όπου μεταφέρονται εντός 48 ωρών σε δεξαμενές αποθήκευσης υγρού αζώτου (liquid N₂) για μακροχρόνια φύλαξη.

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

Τα cryotubes μεταφέρθηκαν από τις δεξαμενές αποθήκευσης υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο 37°C για μερικά λεπτά, έως ότου ξεπαγώσουν. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνα τύπου falcon 15 ml, ο οποίος περιείχε 5ml θρεπτικό υλικό DMEM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά στους 4°C και κατόπιν απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού και το εναιώρημα διαμοιράστηκε σε κατάλληλο αριθμό φλασκών καλλιέργειας.

Συγχρονισμός κυττάρων

Για τα Chromatin Immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) πειράματα, καθώς και για τα νεοσυντιθέμενα RNA, τα κύτταρα μετά από μία εβδομάδα σε καλλιέργεια και με πληρότητα περίπου στο 85%, επώαστηκαν για 72ώρες σε θρεπτικό υλικό με πολύ χαμηλό ποσοστό ορού (0,5%). Στη συνέχεια τα κύτταρα απελευθερώθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (ορός 10%) για 3ώρες πριν το πείραμα. Με αυτόν τον τρόπο αυξήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονταν στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου τη στιγμή της ακτινοβολήσης, περιορίστηκε η ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων και αυξήθηκε το ποσοστό της φυσιολογικής μεταγραφής.

Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της μεταγραφής DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, Calbiochem) και το EU (Ethylene Uridine) ως ανάλογο Ουριδίνης για σήμανση του νεοσυντιθέμενου RNA για τα πειράματα nascent RNA-seq (Click-iT Nascent RNA Capture Kit, Thermo Fisher Scientific). Τα παραπάνω τοποθετήθηκαν απευθείας στο θρεπτικό υλικό, σε συγκεντρώσεις και χρονικά πλαίσια που περιγράφονται αναλυτικά στα πειράματα.

UV-C Ακτινοβολήση κυττάρων

Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε UV-C ακτινοβολία (254nm, TUV Lamp, Philips). Εφαρμόστηκαν δόσεις που αντιστοιχούσαν σε 8, 15 και 20 J/m². Η ένταση της του υπεριώδους φωτός, η οποία υπολογίστηκε στα 0,28 J/sec, ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με την χρήση του ραδιομέτρου VLX-3W της εταιρείας Vilber.

Από τα κύτταρα αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό, και πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS, ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού υλικού που θα μπορούσαν να απορροφήσουν την ακτινοβολία. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στην ειδική συσκευή για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Τέλος εφόσον ολοκληρώθηκε η ακτινοβολήση, επιστράφηκε στα τρυβλία το θρεπτικό υλικό, με την προσθήκη ή όχι κάποιου αντιδραστηρίου, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες. Τα τρυβλία επιστράφηκαν στους 37°C.

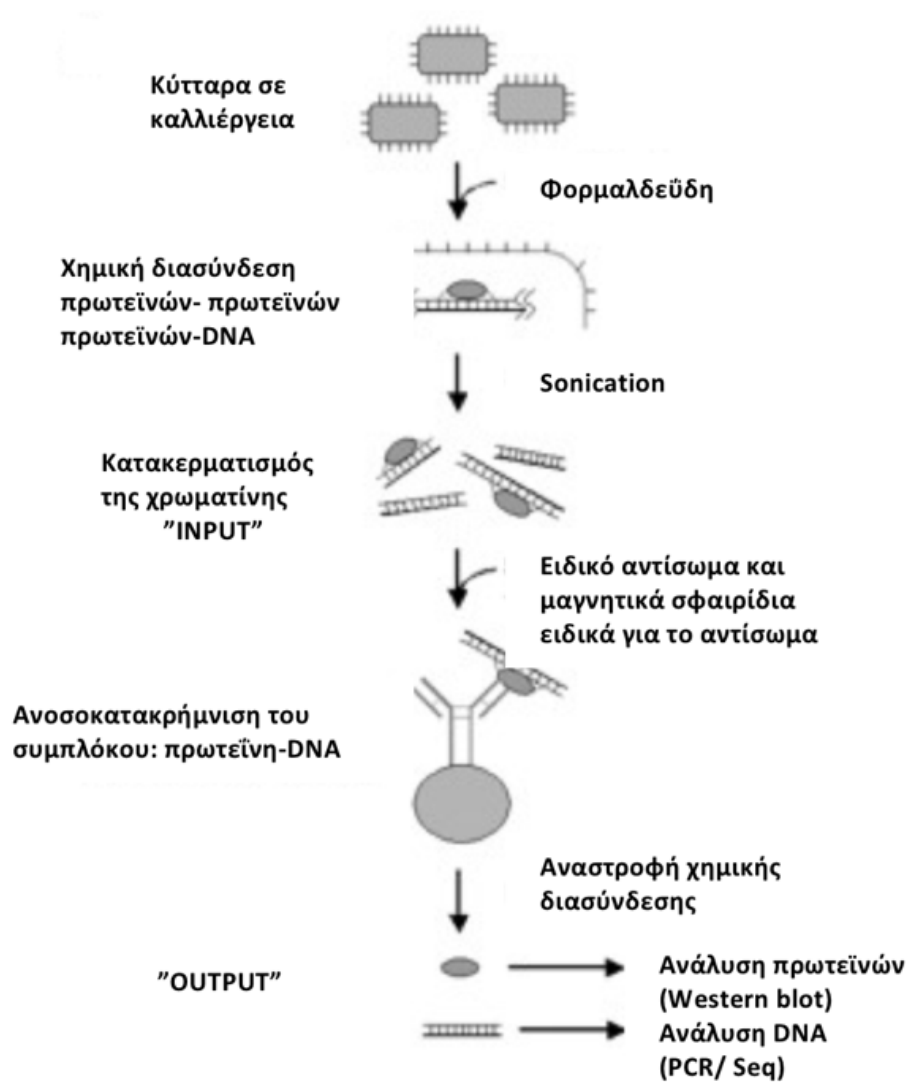
Έλεγχος ικανότητας δημιουργίας αποικιών έπειτα από UV ακτινοβολήση

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργήσουν αποικίες (clonogenic survival assay), επιστρώθηκαν 1000 κύτταρα σε τρυβλία πετρί (p10) και επώαστηκαν για λίγες ώρες στον ειδικό θάλαμο. Έπειτα, τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με αυξανόμενες δόσεις υπεριώδους ακτινοβολίας (δόσεις 0, 2.5 και 5 και 7.5 J/m²). Την 5^η και 10^η μέρα έγινε ανανέωση του θρεπτικού υλικού, ενώ την 14^η μέρα οι αποικίες χρωματίστηκαν. Πιο αναλυτικά για την χρώση των κυττάρων, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο, έγιναν 2 πλύσεις με PBS, στην συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για λίγα λεπτά με διάλυμα χρωστικής το οποίο περιείχε 50% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ, 0,2% w/v Coomassie Brilliant Blue χρώση (Sigma-Aldrich) και τέλος τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με απεσταγμένο νερό. Ο υπολογισμός του αριθμού των αποικιών έγινε με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και ο ελάχιστος αριθμός των κυττάρων ο οποίος θεωρήθηκε ως αποικία ήταν τα 50 κύτταρα.

Χημική διασύνδεση DNA - πρωτεϊνών (*In vivo* crosslinking)

Η φορμαλδεΐδη δημιουργεί μη αναστρέψιμους χημικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνών-DNA, πρωτεϊνών- πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-RNA. Στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων προστέθηκε φορμαλδεΐδη σε τελική συγκέντρωση 1% (από διάλυμα stock 37%). Έπειτα από επώαση για 12 λεπτά, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε γλυκίνη (stock 2.5 M), η

οποία σταματάει την παραπάνω αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 0.125 M για 6 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS 1x και συλλέχθηκαν σε PBS 1x που περιέχει 1 mM EDTA, 0.5mM EGTA και 1 mM PMSF. Τέλος χωρίστηκαν σε ιζήματα των $2 \cdot 10^7$ κυττάρων και είτε χρησιμοποιήθηκαν απευθείας είτε πάγωσαν ακαριαία σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80°C .



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων που ακολουθήθηκαν κατά την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης και περιγράφονται αναλυτικά στις μεθόδους. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια υφίστανται χημική τροποποίηση με φορμαλδεΐδη. Τα κύτταρα λύνονται και ακολουθεί κατακερματισμός της χρωματίνης με υπερήχους (sonication). Στη συνέχεια τα δείγματα επάζονται με ειδικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Αφού προσδεθούν μέσω του αντισώματος σε ειδικά μαγνητικά σφαιρίδια, τα τμήματα του DNA απομονώνονται και αντιστρέφεται η χημική διασύνδεση. Στο σημείο αυτό είναι δυνατόν να αναλυθούν οι πρωτεΐνες που ήταν προσδεμένες στο DNA, με ανάλυση κατά Western καθώς και το DNA ακολουθώντας PCR ανάλυση ή αλληλούχιση (sequencing).

Ανοσοκατακρήμιση Χρωματίνης CHIP

Η διαδικασία απομόνωσης της χρωματίνης παρουσιάζεται υπό τη μορφή πρωτοκόλλου.

Σημείωση: Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) στην προτεινόμενη συγκέντρωση από την κατασκευάστρια εταιρία, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422).

1. Ιζήματα των $2 \cdot 10^7$ κυττάρων διαλύθηκαν σε 1,5 ml διαλύματος Chro-Lysis (50 mM HEPES-KOH pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 140 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% IGEPAL, 0.25% Triton X-100, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C με περιστροφή σε κατάλληλο μηχάνημα (rotator).
2. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2800 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο (που αντιπροσωπεύει το διαλυτό περιεχόμενο κυτταροπλάσματος και πυρήνα) απομακρύνθηκε.
3. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 1,5 ml διαλύματος Wash Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM NaPy, αναστολείς πρωτεασών) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C με περιστροφή.
4. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2800 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε.
5. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 700 ml διαλύματος RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 10 mM NaPy, αναστολείς πρωτεασών) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο.
6. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο πάγου του Bioruptor Sonicator (Diagenode), όπου πραγματοποιήθηκε κατακερματισμός της χρωματίνης με χρήση υπερήχων (sonication), για 25 λεπτά (2 κύκλοι sonication των 12.5 λεπτών) με τη ρύθμιση 30 δευτερόλεπτα ενεργός (ON)/30 δευτερόλεπτα ανενεργός (OFF).

7. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια το υπερκείμενο μοιράστηκε σε eppendorf και είτε χρησιμοποιήθηκε απευθείας, είτε αποθηκεύτηκε στους -80°C.
8. Η χρωματίνη μετρήθηκε με σπεκτροφωτόμετρο NanoDrop κατά προσέγγιση (εφόσον δεν είναι καθαρό DNA) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με ίση ποσότητα χρωματίνης για κάθε δείγμα. Η ποσότητα της χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ήταν 200-350 μg/ip για κάθε αντίδραση.
9. Για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης, η χρωματίνη μαζί με το αντίσωμα επώαστηκε αναδεδυόμενη για 12-15 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C. Για δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα χρωματίνης χωρίς την προσθήκη αντισώματος και είναι αυτό που χαρακτηρίζεται ως input.
10. Εντωμεταξύ τα μαγνητικά σφαιρίδια που θα χρησιμοποιηθούν την επόμενη ημέρα πρέπει να «μπλοκαριστούν» ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση. Χρησιμοποιήθηκαν 4.2 μl Dynabeads Protein A ή G ανά μg αντισώματος. (Dynabeads magnetic beads A(10001D) ή G(10003D), Thermo Fisher Scientific). Το Eppendorf τοποθετήθηκε στον μαγνήτη και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια τα beads ξεπλύθηκαν μία φορά με νερό και στη συνέχεια με RIPA. Τέλος προστέθηκε RIPA και 30 μg/ml BSA (Bovine Serum Albumin, B9000S New England Biolabs). Ακολούθησε επώαση overnight με ήπια περιστροφή στους 4°C.

Τα αντισώματα για ανοσοκατακρήμνιση

RNAPII CTD (rabbit polyclonal, phosphor-S2, ab5095, Abcam), 2μg/ip

RNAPII CTD (rat monoclonal, phosphor-S5, e38 04-1572, Merck Millipore), 4μg/ip

RNAPII CTD (mouse monoclonal, clone 8WG16, 05-952, Millipore), 6μg/ip

pan-RNAPII (Rpb1 N- terminus) (EPR1509Y, ab76123, Abcam) 2μg/ip

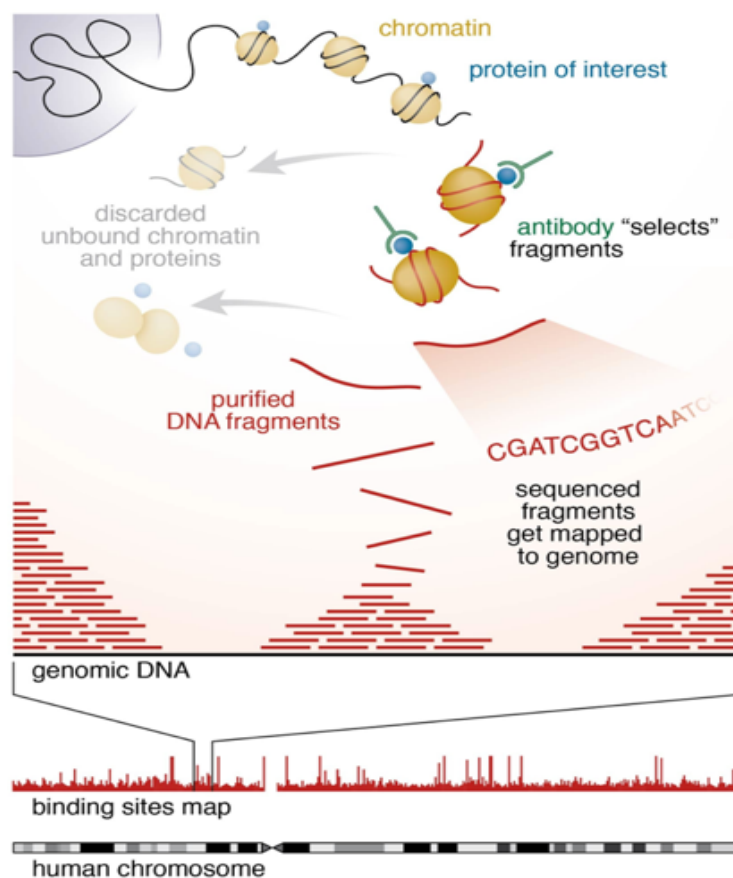
CSB E-18 (goat polyclonal IgG, sc-10459, Santa Cruz), 5μg/ip

CSB E-6 (mouse monoclonal IgG_{2a}, sc-398022, Santa Cruz), 5μg/ip

CSB (rabbit polyclonal, NB100-61070, Novus), 5μg/ip

11. Το δείγμα με τη χρωματίνη και το αντίσωμα προστέθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε μαγνητικά σφαιρίδια, από τα οποία είχε αφαιρεθεί το υπερκείμενο, και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες, με ήπια περιστροφή στους 4°C.
12. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επώαστηκαν για 5 λεπτά με διάλυμα RIPA και στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
13. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επώαστηκαν για 5 λεπτά με διάλυμα RIPA υψηλής περιεκτικότητας σε χλωριούχο νάτριο, τελικής συγκέντρωσης 500 mM NaCl και στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
14. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επώαστηκαν για 5 λεπτά με διάλυμα με διάλυμα χλωριούχου λιθίου (10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM LiCl, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1 mM EDTA, 0.5MM EGTA, 0.5% TritonX-100 και αναστολείς πρωτεασών).

ChIP για Q-PCR και για sequencing (ChIP-QPCR , ChIP-seq)



Εικόνα 12 τροποποιημένη από Illumina. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ChIP-seq.

Η τεχνική αυτή αποσκοπεί στην ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, δηλαδή την απομόνωση των περιοχών DNA στις οποίες προσδένεται ένας συγκεκριμένος παράγοντας-πρωτεΐνη. Οι περιοχές αυτές είτε ανιχνεύονται και μελετώνται μέσω ενίσχυσης με Q-PCR, είτε εναλλακτικά πραγματοποιείται αλληλούχιση (sequencing) ολόκληρου του κατακρημνισμένου DNA ώστε να χαρακτηρισθούν και να αναλυθούν όλες οι περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης επί του γονιδιώματος σε λογισμικό Genome Browser.

Έπειτα από το βήμα 14, τα μαγνητικά σφαιρίδια επώαστηκαν σε διάλυμα που περιείχε 1% SDS και 100 mM NaHCO₃, δύο φορές στους 65°C για 10 λεπτά ώστε να αποσυνδεθεί η χρωματίνη από αυτά. Στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε 200 mM NaCl και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 12-15 ώρες (overnight). Έτσι επιτυγχάνεται η αναστροφή της χημικής τροποποίησης που επιτέλεσε η εφαρμογή της φορμαλδεΐδης (reverse crosslinking). Την επόμενη μέρα προστέθηκε πρωτεϊνάση K (0.1 ng/ml) για 1 ώρα στους 55°C, σε διάλυμα TE, 0,5% SDS για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

Καθαρισμός και απομόνωση DNA

Για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των πρωτεϊνών και την κατακρήμνιση του DNA προστέθηκε γλυκογόνο (20 mg/ml), οξικό νάτριο (3 M sodium acetate 1/10 του όγκου του δείγματος), και αιθανόλη (100%, 2,5 φορές ο όγκος του δείγματος) και τα δείγματα επώαστηκαν 12-15 ώρες (overnight) στους -80°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 20 λεπτά στους 4°C και ο ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Αφού εξατμίστηκε όλη η αιθανόλη, προστέθηκε απιονισμένο νερό ελεύθερο από DNAάσες και RNAάσες (ultrapure distilled water, dnase-rnase free, 10977, Life Technologies).

Το DNA απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Minelute Reaction Cleanup Kit, Qiagen). Το καθαρό DNA μετρήθηκε με φασματόμετρο Qubit 2.0 fluorometer (qubit dsDNA HS Assay kit, Thermo Fisher Scientific).

Στο σημείο αυτό, το DNA χρησιμοποιήθηκε είτε για Q-PCR είτε για την κατασκευή βιβλιοθηκών για αλληλούχιση (sequencing). Στη δεύτερη περίπτωση, χρειάστηκε ποσότητα 10-20 ng DNA ανά πειραματική συνθήκη. Όλα τα πειράματα ChIP-seq πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον 2 βιολογικά δείγματα.

ChIP-western, ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για ανοσοαποτύπωση κατά western

Η τεχνική αυτή αποσκοπεί στην ανίχνευση των πρωτεϊνών οι οποίες είναι προσδεμένες στο τμήμα του DNA που απομονώνεται με την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.

Έπειτα από το βήμα 14, στα δείγματα προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος 2x loading dye (100 mM Tris PH 6.8, 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 20%(v/v) γλυκερόλη, 200 mM DTT). Τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 50λεπτά ώστε να επιτευχθεί αναστροφή της χημικής τροποποίησης που επιτέλεσε η εφαρμογή της φορμαλδεΐδης (reverse crosslinking) και να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηγάδια προκατασκευασμένων πηκτωμάτων διαβαθμισμένης πυκνότητας (gradient gel, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels, Thermo Fischer, Cat. No NP0321BOX). Έτσι, τόσο οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους όσο και οι μικρότερου να διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα και είναι δυνατόν να μελετηθούν ταυτόχρονα. Ίση ποσότητα δειγμάτων «φορτώθηκε» στα πηγαδάκια καθώς και ποσότητα 5μl δείγματος δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Dual Colour Standards, BIORAD, Cat No. 1610394). Η συσκευή καλύφθηκε από 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (χρησιμοποιώντας κατάλληλη αραιώση σε H₂O του 20x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer, Cat No. NP001) και στη συνέχεια εφαρμόστηκε τάση 130V για περίπου 1ώρα και 30 λεπτά.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε η ηλεκτρο-μεταφορά (transfer) του πρωτεϊνικού υλικού από το πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF (Millipore, Cat No. IPFL00010). Η ηλεκτρο-μεταφορά πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικής συσκευής. Η συσκευή συμπληρώθηκε με κατάλληλο διάλυμα (1x Transfer Buffer), του οποίου η σύσταση εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών: Για πρωτεΐνες μεγαλύτερες των 120 kDa χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) που περιέχει 1% SDS, ενώ για πρωτεΐνες μικρότερες των 120 kDa χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) που περιέχει 20% μεθανόλη. Η ηλεκτρο- μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή στους 4°C, overnight. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 28 V για πρωτεΐνες μεγαλύτερες από 25 kDa ενώ 18 V εφαρμόστηκαν για πρωτεΐνες μικρότερες του μοριακού βάρους των 25 kDa.

Οι μεμβράνες επώαστηκαν για 8 ώρες στους 4°C σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (Blocking Buffer) το οποίο αποτελείται από PBS 1x: Licor (Odyssey Blocking Buffer, Cat No. 927-40000) σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια προστέθηκε το επιθυμητό πρωτογενές αντίσωμα, σε διάλυμα PBS 1x: Licor: 0.1% Tween 20. Η επώαση έγινε στους 4°C, overnight. Την επόμενη ημέρα οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 4 φορές με PBS 1x:Tween 20 0.1%, με 5 λεπτά επώασης για κάθε πλύση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η επώαση με το επιθυμητό δευτερογενές αντίσωμα, σε αραιώση 1:10000, για 45-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 4 πλύσεις με PBS 1x:Tween 20 0.1% και μία πλύση με PBS 1x, οι μεμβράνες

μεταφέρθηκαν σε ειδικό μηχάνημα απεικόνισης (Odyssey CLX Imaging System), όπου οπτικοποιήθηκε το ανοσοαποτύπωμα.

Συλλογή ολικού RNA

Για τη συλλογή ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα επιστρωμένα σε τρυβλία επιφάνειας 55 τ.εκ., με πυκνότητα περίπου 80%. Αφού αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500 μl τριζόλης (Trizol, Life technologies). Μετά από επώαση για 5 λεπτά σε πάγο, προστέθηκαν 100 μl χλωροφόρμιο (A1935 chloroform-isoamyl 24:1, Appllichem) και αναδεύτηκαν με συσκευή vortex για λίγα δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 12.000 g. Μετά τη φυγοκέντρηση είναι ορατές τρεις φάσεις. Προσεκτικά έγινε συλλογή της άνω φάσης σε νέο φιαλίδιο erpendorf. Προκειμένου να κατακρημνισθεί το RNA, προστέθηκε γλυκογόνο 20μg, οξικό νάτριο 3M pH5.5 1/10 του όγκου του δείγματος και τέλος 2,5 όγκοι παγωμένης 100% αιθανόλης. Τα δείγματα έπειτα παρέμειναν για τουλάχιστον 12-16 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 16.000 στροφές το λεπτό (rpm) στους 4°C, και το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Αφού εξατμίστηκε η αιθανόλη το ίζημα διαλύθηκε σε καθαρό νερό. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ποσότητα νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα με το φασματόμετρο nanodrop.

Στο δείγμα μέχρι αυτό το στάδιο, εκτός από το RNA, υπάρχει και μία ποσότητα DNA. Για να απαλλαγούμε από το DNA, 20 μg επώαστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά με το ένζυμο DNase, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Turbo DNase, Ambion, Life Technologies). Στη συνέχεια γίνεται ακολούθησε καθαρισμός με όξινη φαινόλη (acid phenol) chloroform pH 4,5 (ThermoFisher Scientific) ίσο όγκο, ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 16.000 στροφές το λεπτό (rpm).

Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο φιαλίδιο erpendorf και εκεί προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφόρμιου (A1935 chloroform-isoamyl 24:1, Appllichem). Ακολούθησε ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση στις 16.000 στροφές το λεπτό (rpm) και τελικά κατακρήμνιση για τουλάχιστον 12-16 ώρες στους -80°C. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 16.000 στροφές το λεπτό στους 4°C και το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Το ίζημα διαλύθηκε σε καθαρό νερό. Η συγκέντρωση του RNA μετρήθηκε στο φασματόμετρο nanodrop και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Επιλογή ώριμου αγγελιοφόρου RNA (mature mRNA)

Για την απομόνωση του ώριμου mRNA χρησιμοποιήθηκε 2 φορές ανά δείγμα το kit της NEB (Magnetic mRNA isolation kit- S1550S), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ξεκινώντας από 5 µg ολικού RNA.

Με τη μέθοδο αυτή οι poly(A) ουρές των ώριμων μορίων mRNA επιλέγονται, καθώς προσδένονται στα μαγνητικά σφαιρίδια που διαθέτουν την συμπληρωματική τους αλυσίδα από θυμίνη (T). Το mRNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε ως καλούπι για τη σύνθεση δίκλωνου cDNA. Από το cDNA κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Επιλογή νεοσυντιθέμενου (nascent) RNA

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του nascent RNA είναι ίδιο με το αυτό για την απομόνωση του ολικού RNA όσον αφορά την συλλογή του RNA.

Για τα πειράματα απομόνωσης του νεοσυντιθέμενου RNA (nRNA), η διαφορά είναι πως 5 λεπτά πριν την συλλογή του ολικού RNA με τριζόλη είχε προστεθεί το ανάλογο ουριδίνης EU, 100 µM Click-iT™ (Nascent RNA Capture Kit, C10365, ThermoFisher Scientific). Το EU συμμετέχει στη σύνθεση του νέου RNA, και με αυτόν τον τρόπο γίνεται και η επιλογή του σε επόμενο στάδιο.

Για τα πειράματα pulse-chase, το EU προστέθηκε στα κύτταρα μισή ώρα πριν την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και παρέμεινε για μισή ώρα μετά. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε, ακολούθησε πλύση με PBS, και αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς EU, το οποίο παρέμεινε έως την λύση των κυττάρων και την απομόνωση του ολικού RNA με trizol. Σε αυτήν την περίπτωση στόχος ήταν να διερευνηθεί αν και για πόσο χρονικό διάστημα το RNA που παράχθηκε αμέσως μετά το UV παραμένει στα ίδια σημεία.

Για κάθε δείγμα nRNA χρησιμοποιήθηκε αρχική ποσότητα καθαρού ολικού RNA 5-10 µg. Μετά από τη δράση του ενζύμου DNase ακολούθησε επιλογή μόνο των μορίων που αποτελούνται από EU. Αυτό επιτεύχθηκε με την ειδικότητα της χημείας biotinyne-azide -EU κάνοντας χρήση του πακέτου Click-iT™ (Nascent RNA Capture Kit, C10365, ThermoFisher Scientific) το οποίο περιέχει μαγνητικά σφαιρίδια με biotin-azide. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, με τροποποίηση στο στάδιο σύνθεσης του cDNA.

Σύνθεση cDNA από nRNA και από mRNA

Για τη σύνθεση του cDNA από το nRNA, χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό υλικό το nRNA, χωρίς να αποδεσμευτεί από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Πραγματοποιήθηκε, δηλαδή, σύνθεση του cDNA πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια (on beads cDNA synthesis). Το Nascent RNA, που έχει συνδεθεί ειδικά στα μαγνητικά σφαιρίδια, χρησιμοποιείται ως καλούπι για την σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA. Έπειτα αυτός ο κλώνος χρησιμοποιείται για την σύνθεση και του δεύτερου κλώνου οπότε τελικά προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο DNA. Αυτό αποδεσμεύεται από τα σφαιρίδια και εντοπίζεται στο υπερκείμενο.

Αρχικά για τον κερματισμό του RNA (fragmentation), σε 11 μl nRNA προστέθηκε SS synthesis buffer (NewEngland Biolabs B6117), με τελική συγκέντρωση 2x και DDT 10 mM (από το πακέτο SuperScript™ III Reverse Transcriptase invitrogen 18080093). Τα δείγματα, τελικού όγκου 22 μl, παρέμειναν στους 94 °C για 4 λεπτά και αμέσως η θερμοκρασία έπεσε στους 4 °C. Μόλις η θερμοκρασία έπεσε, προστέθηκε 1 μl RNaseOUT (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor invitrogen 10777019) και τυχαία εξαμερή νουκλεοτιδίων (random hexamer invitrogen 1162832) 3 μg/μl, τα οποία λειτουργούν ως εκκινήτες για τη σύνθεση. Η θερμοκρασία ανέβηκε στους 50 °C για ένα λεπτό και στη συνέχεια έπεσε ξανά στους 4 °C. Στο σημείο αυτό προστέθηκαν: DDT με τελική συγκέντρωση 10 mM, νουκλεοτίδια (dNTPs 10297-018 Invitrogen) 0,625 mM, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση 0,5 μl (SuperScript™ III Reverse Transcriptase invitrogen 18080093) και καθαρό νερό. Ο τελικός όγκος ήταν 42 μl. Η θερμοκρασία ανέβηκε για 10λεπτά στους 25 °C, απευθείας στους 50 °C για τα επόμενα 50λεπτά και στους 70 °C για 15 λεπτά. Τέλος επέστρεψε στους 4 °C.

Για τη σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας προετοιμάστηκε ένα μίγμα των ενζύμων DNA polI (E.coli) (NewEngland Biolabs M0209), και RNase H (NewEngland Biolab M0297). Ανά αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 24 Units DNA polI και 20 Units RNase H. Στην αντίδραση δεν προστέθηκε λιγάση, καθώς η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει τις εγκοπές που δημιουργεί η RNase H (5'→3' exonuclease activity). Στο cDNA προστέθηκαν: 10x SS synthesis buffer (NewEngland Biolabs B6117), τελικής συγκέντρωσης 1x, καθαρό νερό, το μίγμα ενζύμων και dNTPs τελικής συγκέντρωσης 0,19 mM. Τα δείγματα, που είχαν τελικό όγκο 100 μl, τοποθετήθηκαν στους 16 °C για 2,5 ώρες. Σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, σε διαστήματα 10-15 λεπτών, τα δείγματα αφαιρούνταν από την μηχανή PCR και ανακινούνταν διότι μαγνητικά σφαιρίδια επικάθονταν στο φιαλίδιο. Μετά την αντίδραση, το cDNA εντοπίστηκε στο υπερκείμενο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μαγνήτη και επιλέχθηκε

το υπερκείμενο. Τελικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA με μαγνητικά σφαιρίδια Ampure (Agencourt Ampure XP beads, Beckman) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναλύεται παρακάτω. Στη συνέχεια το cDNA χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία βιβλιοθηκών.

Για τη σύνθεση cDNA από mRNA ακολουθήθηκε το παραπάνω πρωτόκολλο, με τη διαφορά στο ότι το αρχικό υλικό δεν ήταν δεσμευμένο σε μαγνητικά σφαιρίδια όπως στο mRNA, αλλά ελεύθερο σε διάλυμα.

Κατασκευή DNA βιβλιοθηκών για αλληλούχιση

Τα δίκλινα τμήματα DNA που προήλθαν είτε από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, είτε από το RNA (cDNA), χρειάστηκαν αρχικά τροποποίηση ώστε να μπορέσουν να αποσταλούν για αλληλούχιση. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει σαν αποτέλεσμα την μοριακή πρόσδεση στο DNA ειδικής αλληλουχίας 6 νουκλεοτιδίων, η οποία λειτουργεί σαν μοριακή ταυτότητα. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει την παράλληλη αλληλούχιση πολλών δειγμάτων μαζί, καθώς έπειτα γίνεται η αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων με βιοπληροφορική ανάλυση στο εκάστοτε δείγμα. Αναλυτικά η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

Αρχικά στο DNA που έχει κατακερματιστεί με υπερήχους (υλικό από CHIP) είτε με χημική εξεργασία (cDNA), δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα με την αντίδραση ER (End Repair). Ουσιαστικά επιδιορθώθηκε το DNA που στις άκρες που έλειπαν νουκλεοτιδία από την μια αλυσίδα. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε ως εξής: Σε 1-10 ng DNA προστέθηκε 10x T4 DNA ligase Buffer (NEB B0202), τελικής συγκέντρωσης 1x, dNTPs (10297-018 Invitrogen), τελικής συγκέντρωσης 0,4 mM, μίγμα ενζύμων και νερό έως τα 25 μl. Το μίγμα ενζύμων αποτελείτο από: T4 DNA polymerase (M0203) (0,7Units/αντίδραση), Klenow fragment DNA polymerase (M0210) (0,2Units/αντίδραση), και T4 DNA PNK (M0201) (0,7Units/αντίδραση).

Το DNA καθαρίστηκε με τη χρήση ειδικών κολόνων (Minelute reaction clean up kit, Qiagen), ώστε να μειωθεί και ο όγκος του και επαναδιαλύθηκε σε 16.5 μl.

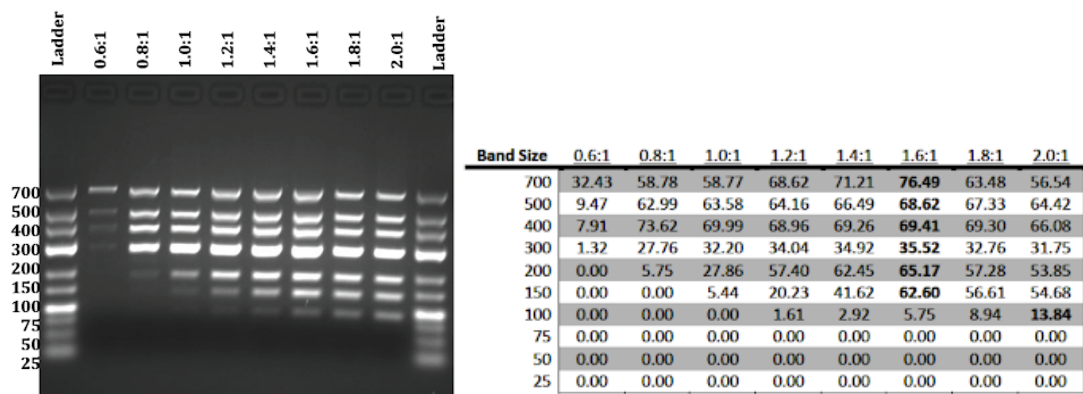
Στη συνέχεια στα τυφλά 3' άκρα προστέθηκε αλυσίδα με επαναλαμβανόμενα μόρια αδενίνης (A-base addition). Η αντίδραση έγινε ως εξής: στα δίκλινα τμήματα DNA προστέθηκε 10x Neb buffer 2 (B7002) τελικής συγκέντρωσης 1x, dATP (10297-018 Invitrogen) 0,5 mM, και το ένζυμο Klenow 3->5 exo (M0212), 2,5 Units. Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 20 μl. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 30λεπτά.

Το DNA καθαρίστηκε με τη χρήση ειδικών κολόνων (Minielute reaction clean up kit, Qiagen), ώστε να μειωθεί και ο όγκος του και επαναδιαλύθηκε σε 20 μl.

Στο επόμενο στάδιο πάνω στην poly-A αλυσίδα προσδέθηκαν ειδικές αλληλουχίες Illumina (NEBNext adapters) που αποτελούνται από 6 νουκλεοτίδια. Αυτά καθορίζουν την ταυτότητα του κάθε δείγματος (indexes). Στο DNA προστέθηκαν αποδιατεταγμένοι truseq adapters 0,25-0,75 pmoles/αντίδραση, ανάλογα με την αρχική ποσότητα DNA. Σε αυτό το στάδιο είναι σημαντικό να μην τοποθετηθεί μεγάλη συγκέντρωση, καθώς αν οι adapters είναι πολλοί περισσότεροι υπάρχει περίπτωση να συνδεθούν μεταξύ τους, δημιουργώντας διμερή τα οποία προφανώς είναι ανεπιθύμητα στο υλικό που θα αποσταλεί για αλληλούχιση. Οι adapters παρέμειναν στο δείγμα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2x Quick ligase buffer (NEB B2200), τελικής συγκέντρωσης 1x, και Quick ligase (NEB M2200), 2000 U και νερό, σε τελικό όγκο 50 μl. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 25°C για 20 λεπτά.

Το DNA καθαρίστηκε και ακολούθησε διαχωρισμός με βάση το μοριακό βάρος. Με την εφαρμογή διαδοχικών καθαρισμών με Ampure beads (Agencourt Ampure XP beads, Beckman), και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, επιλέχθηκαν τα κλάσματα μικρότερα από 1000 ζεύγη βάσεων και μεγαλύτερα από 150 ζεύγη βάσεων (απόρριψη διμερών). Πιο αναλυτικά, κατά τον πρώτο καθαρισμό, προστέθηκε ίσος όγκος beads με το δείγμα (1.0:1). Έτσι, μετά το πέρας των 15 λεπτών επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, στα beads είχε προσδεθεί το DNA με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 150 ζ.β. Ακολούθως, τα beads ξεπλένονται 2 φορές με 80% αιθανόλη και τέλος γίνεται έκλουση για 5 λεπτά σε EB (Qiagen) 10 mM Tris-Cl, pH 8.5.

Κατά τον δεύτερο καθαρισμό προστέθηκε ξανά ίσος όγκος beads (1.0:1) με τη διαφορά πως αυτή τη φορά επώαστηκαν μόνο για 5 λεπτά, και αυτά τα beads απορρίφθηκαν. Τα μοριακά βάρη που πρόλαβαν να προσδεθούν σε αυτό το χρονικό διάστημα ήταν τα πολύ υψηλά και με αυτόν τον τρόπο το δείγμα απαλλάχθηκε από αυτά. Τέλος, στο υπερκείμενο προστέθηκαν 2 όγκοι beads (2.0:1), επώαστηκαν κανονικά για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έτσι έγινε λήψη όλου του DNA που είχε απομείνει.



Εικόνα 13 Επιλογή του DNA με βάση το μοριακό βάρος με τη χρήση των Ampure beads, Keats lab, published online. (<http://www.keatslab.org/blog/pcrpurificationampureandsimple>)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε real time PCR με ειδικούς εκκινητές που προσδένονται στους adapters (Illumina P5 και P7 primers). Με αυτόν τον τρόπο ενισχύθηκε η ποσότητα των δειγμάτων που είχαν λάβει τους adapters. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε ως εξής: 1 μl DNA από το δείγμα χρησιμοποιήθηκε για rtPCR, σε 1x kappa HiFi real time DNA polymerase (KK2701 Kapa Biosystems) και μίξη εκκινητών truseq 5 μM ο καθένας (primer 1 : AATGATACGGCGACCACCGA*G and primer 2: CAAGCAGAAGACGGCATACGA*G).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 15 μl με το εξής πρωτόκολλο: 98 °C για 45 sec, 25 κύκλοι: 98 °C 15 sec, 63 °C 30 sec, 72 °C 30 sec, 65 °C 60 sec, 95 °C 1 sec continuous. Το τελικό προϊόν της rtPCR, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν διμερών εκκινητών και να ελεγχθεί η τιμή του μοριακού βάρους του προϊόντος. Εφόσον τα προηγούμενα αποτελέσματα κρίθηκαν αποδεκτά, οι καμπύλες της rtPCR χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των κύκλων που απαιτούνταν για την πραγματοποίηση της τελικής συμβατικής PCR. Έτσι υπολογίστηκε σε ποιον κύκλο ξεκινά ο πολλαπλασιασμός του υλικού για κάθε δείγμα.

Με την τελική PCR πολλαπλασιάστηκε κάθε δείγμα με σκοπό να καταλήξουμε στην επιθυμητή συγκέντρωση που χρειάζεται για την αλληλούχιση. Η αντίδραση έγινε ως εξής: σε 8 μl DNA προστέθηκε το μίγμα 1x Kappa HiFi Hotstart DNA polymerase (Kapa Biosystems, KK2601) και 10 mM από τους παραπάνω primers για κάθε αντίδραση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl με το εξής πρωτόκολλο: 98 °C για 45sec, «οι επιθυμητοί» κύκλοι: 98 °C 15sec, 63 °C 30sec, 72 °C 1min, 4 °C forever. Σε όλα τα δείγματα, ανεξαρτήτως προέλευσης οι κύκλοι που εφαρμόστηκαν ήταν το πολύ 15, καθώς έτσι αποφεύχθηκε ο υπερπολλαπλασιασμός ορισμένων περιοχών, κάτι που θα δημιουργούσε ψευδή αποτελέσματα κατά την αλληλούχιση.

Τέλος, έγινε έλεγχος της ποιότητας και του μεγέθους των βιβλιοθηκών με Bioanalyzer (High Sensitivity DNA kit, Agilent) και μετρήθηκε η ακριβής ποσότητα σε ng με το Qubit ds High Sensitivity (Invitrogen Q32854).

Αλληλούχιση

Για την αλληλούχιση, τα δείγματα στάλθηκαν στην Genecore-EMBL με την πλατφόρμα Illumina HiSeq 2000 σε ρύθμιση 50bp ανα κομμάτι ανάγνωσης. Τα αποτελέσματα επιστράφηκαν σε ψηφιακή μορφή. Αυτά αντιπροσωπεύουν εκατοντάδες εκατομμύρια αναγνώσεις μικρο-αλληλουχιών (sequence reads) μήκους 50 νουκλεοτιδίων, τα οποία αποκωδικοποιήθηκαν και στη συνέχεια έγινε η βιοπληροφορική τους ανάλυση από εξειδικευμένο προσωπικό του εργαστηρίου της Δρ. Μαρίας Φουστέρη.

Ποιοτικός έλεγχος και ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης

Για την ανάλυση των δεδομένων CHIP-seq, RNA-seq και nRNA-seq, αναπτύχθηκε αυτοματοποιημένη μεθοδολογία ανάλυσης από τους Δ. Κωνσταντόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα και M. Lavigne, PhD, οι οποίοι συνδύασαν διαθέσιμα προγράμματα με νέο λογισμικό:

Για τα CHIP-seq δεδομένα, αρχικά ελέγχθηκε η ποιότητα και εφαρμόστηκε κατάλληλη επεξεργασία των πρωτογενών αρχείων αλληλούχισης (fastq): απαλείφθηκαν οι βάσεις χαμηλής ποιότητας καθώς και οι ακολουθίες βάσεων που αντιστοιχούν σε προσαρμοστές. Στη συνέχεια τα διαβάσματα (reads) αντιστοιχίστηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς, με τη χρήση του προγράμματος bwa v. 0.7.12 (Li and Durbin, 2009), επιτρέποντας τις αναντιστοιχίες και λαμβάνοντας υπόψη πιθανά λάθη αλληλούχισης καθώς και διαφοροποιήσεις του γονιδιώματος αναφοράς με αυτό των εξεταζόμενων κυττάρων. Οι αντιστοιχίσεις επεξεργάστηκαν και αποκλείστηκαν οι μη κανονικές μαζί με τις μιτοχονδριακές αντιστοιχίσεις. Εξαλείφθηκαν οι διπλότυπες αντιστοιχίσεις, ώστε να ελαχιστοποιηθούν ψευδή αποτελέσματα που οφείλονται στην PCR, και το σήμα των αντιστοιχίσεων κανονικοποιήθηκε μεταξύ όλων των αρχείων αντιστοίχισης (bam, bed files). Τέλος, δημιουργήθηκαν εγγραφές για τα γονιδιακά προγράμματα περιήγησης UCSC και IVG για την οπτικοποίηση του σήματος.

Για την ανάλυση των δεδομένων nRNA-seq, και RNA-seq αναπτύχθηκε αυτοματοποιημένη μεθοδολογία ανάλυσης από τους παραπάνω: Αρχικά έγινε έλεγχος της ποιότητας και κατάλληλη επεξεργασία των πρωτογενών αρχείων (fastq). Απαλείφθηκαν οι

βάσεις χαμηλής ποιότητας καθώς και οι ακολουθίες βάσεων που αντιστοιχούν σε προσαρμοστές. Στη συνέχεια τα διαβάσματα (reads) αντιστοιχίστηκαν έναντι της ριβοσωμικής DNA ακολουθίας, με το πρόγραμμα bowtie v 1.1.0 (Langmead et al., 2009), επιτρέποντας 1 αναντιστοιχία, ώστε τελικά να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα του ριβοσωμικού RNA από τις βιβλιοθήκες. Τα υπόλοιπα, μη ριβοσωμικά διαβάσματα αντιστοιχήθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς, επιτρέποντας 2 αναντιστοιχίες. Οι μη κανονικές αναντιστοιχίες απομακρύνθηκαν μαζί με τις μιτοχονδριακές και απαλείφθηκαν τα διπλότυπα. Τέλος δημιουργήθηκαν εγγραφές για τα γονιδιακά προγράμματα περιήγησης.

Αναστολή μεταγραφής με τη χρήση DRB

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της μεταγραφής DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, Calbiochem).

Για τα πειράματα DRB-nRNA, είχε γίνει συγχρονισμός της μεταγραφής αυτός είχε επιτευχθεί με χρήση του αναστολέα DRB 100 μM για 3 ώρες απευθείας στο θρεπτικό μέσο. Μετά το πέρας του χρόνου το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και προστέθηκε νέο, χωρίς τον αναστολέα. Ακολούθησε σήμανση με EU και συλλογή του ολικού RNA, όπως περιγράφηκε.

Για τα πειράματα preDRB- ChIP-seq στην πρώτη περίπτωση τα κύτταρα επώαστηκαν με DRB για 12 ώρες και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν και αφέθηκαν να ανακάμψουν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Στη δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν, αφέθηκαν να ανακάμψουν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό, και το DRB προστέθηκε στις 15 ώρες μετά την ακτινοβολήση και παρέμεινε για 3 ώρες. Ακολούθησε Crosslinking και η χρωματίνη απομονώθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω.

Εντοπισμός του νεοσυντιθέμενου RNA με ανοσοφθορισμό

Τα κύτταρα, αφού είχαν συγχρονιστεί στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπως περιγράφεται παραπάνω ακτινοβολήθηκαν στα 15 J/m² και επιστράφηκαν στους 37 °C για να ανακάμψουν. Πριν τη μονιμοποίησή τους, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε 0,1 mM EU (CLK-N002, Jena Bioscience), για 2 ώρες, όπως έχει περιγραφεί (Smith and Shilatifard, 2013). Εν συντομία, τα κύτταρα μετά το πέρας των 2 ωρών, πλύθηκαν με PBS, μονιμοποιήθηκαν για 20λεπτά στον πάγο (2% Formaldehyde, 0,5% Triton, 300 μM sucrose in PBS) και έγιναν διαπερατά (0,2% Triton in PBS). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η Click-IT αντίδραση, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία 25 μM Alexa Fluor 594 azide, 10 mM sodium ascorbate, 4 mM Copper (II) sulfate και RNaseOUT (Thermo Scientific). Ακολούθησε πλύση με

PBS και σήμανση με DAPI (1:1000). Για την λήψη των εικόνων έγινε χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού Leica με κάμερα Nikon Eclipse. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Damaged-DNA immunoblot analysis (dot- ή slot-blot)

DNA προερχόμενο από ChIP και το input αποδιατάχθηκε, αφού έβρασε για 5λεπτά στους 95 °C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν απευθείας στον πάγο, και προστέθηκε διάλυμα SSC, τελικής συγκέντρωσης 6x. Εντωμεταξύ η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (LI-COR Odyssey, Biosciences) τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή MINIFOLD I slot blot system. Η συσκευή συνδέθηκε στην παροχή κενού. Τα πηγάδια πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα TE. Τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγάδια και ακολούθησε μία πλύση με διάλυμα (30% SSC, 70% TE). Στη συνέχεια η μεμβράνη ψήθηκε για 120 λεπτά στους 80 °C και επώαστηκε σε διάλυμα 1:1 PBS: Odyssey Blocking Buffer (OBB, P/N 927, LI-COR Bioscience) ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Η μεμβράνη επώαστηκε overnight με ένα αντίσωμα ειδικό για τις CPDs βλάβες (CosmoBio USA, CAC-NM-DND-001, Lot: TM C-05) σε 1:1 PBS:OBB. Τέλος η μεμβράνη πλύθηκε και επώαστηκε με δευτερογενές αντίσωμα όπως στα Western blots. Το σήμα ανιχνεύτηκε όπως παραπάνω και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Image Studio (LI-COR Biosciences). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

CPD Immunoprecipitation (CPDIP)-seq

Ο εντοπισμός των CPD βλαβών επιτεύχθηκε τροποποιώντας το πρωτόκολλο του MeDIP-seq (https://www.epigenesys.eu/images/stories/protocols/pdf/20111026125309_p33.pdf). Τα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν (8 J/m^2), τροποποιήθηκαν χημικά με φορμαλδεύδη. Το DNA απομονώθηκε όπως στους μάρτυρες των ChIP πειραμάτων (inputs). Στη συνέχεια το DNA αποδιατάχθηκε και ανοσοκατακρήμνιστηκε. Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με το ειδικό αντίσωμα για τις βλάβες CPDs (Anti Cyclobutane Pyrimidine Dimers, clone TDM-2, cat: NMDND001, lot TMC-05) και με μπλοκαρισμένα μαγνητικά σφαιρίδια που φέρουν την πρωτεΐνη G. Η επώαση διήρκησε για 2 ώρες στους 4 °C, σε διάλυμα 1 x CPDIP (10 mM Na-Phosphate buffer pH 7.0 - Το 1 M διάλυμα παρασκευάστηκε ως εξής: 39 ml από 2 M δισόξινο φωσφορικό νάτριο(NaH_2PO_4) (276 g/L) προστέθηκε σε 61 ml διβασικού φωσφορικού νατρίου 2 M (Na_2HPO_4)(284 g/L), 140 mM NaCl, 0.05 % Triton X-100). Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με διάλυμα CPDIP. Το DNA αποδεσμεύτηκε από τα beads και κατακρήμνιστηκε.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε dot- blot με σκοπό να μετρηθεί η ενίσχυση του κατακρημισμένου DNA σε CPDs, συγκρίνοντας με τα επίπεδα σε ίση ποσότητα DNA των μη ακτινοβολημένων δειγμάτων. Το υλικό αφού ελέγχθηκε με qPCR, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή βιβλιοθηκών, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιεγράφηκε παραπάνω (RNA-seq).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

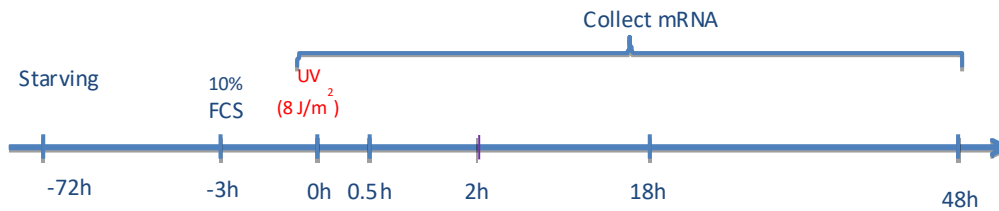
Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (mRNA-seq) πριν και μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA με τη χρήση UV-C ακτινοβολίας

Προκειμένου να εξετάσουμε τα προβλήματα της μεταγραφής που μπορεί να σχετίζονται με τον Cockayne φαινότυπο και για να κατανοήσουμε τις διαφορές στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης σε αυτές τις περιπτώσεις, χρησιμοποιήσαμε τεχνολογίες αιχμής ευρείας ανάλυσης γονιδιώματος και εδραιωμένες εμπορικά διαθέσιμες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από υγιή άτομα και από ασθενείς με CS πριν και μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Αρχικά, για να βρεθεί ο συνολικός αριθμός των γονιδίων, των οποίων η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται παρουσία μη λειτουργικής CSB πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολόκληρης της γονιδιακής έκφρασης (expression level of all 3'mRNAs). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HiSeq της Illumina «Serial Analysis of Gene Expression (SAGE™)» ώστε να αναλυθεί ποιοτικά και ποσοτικά το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης των παραπάνω κυττάρων.

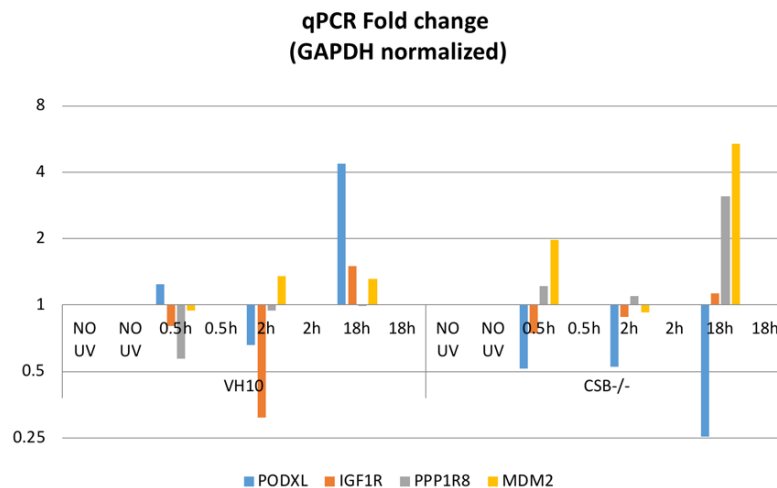
Ολικό RNA απομονώθηκε από φυσιολογικά κύτταρα και από κύτταρα CS ασθενών με μεταλλαγμένο CSB γονίδιο πριν από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας καθώς και σε διαφορετικούς χρόνους μετά, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 14). Τα κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών είχαν προηγουμένως συγχρονιστεί στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό με χαμηλή περιεκτικότητα σε ορό και στη συνέχεια είχαν αφεθεί να εισέλθουν συγχρονισμένα στη φάση G1 μετά από επώαση τους για 3 ώρες σε θρεπτικό υλικό με υψηλή περιεκτικότητα σε ορό.

Μετά την επιλογή του mRNA (βλ. Υλικά και Μεθοδοι), συντέθηκε το cDNA και οι διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών ελέγχθηκαν με qPCR (Εικόνα 15).



Εικόνα 14 Διάγραμμα που απεικονίζει την μεθοδολογία συλλογής mRNA από τα φυσιολογικά και τα CS κύτταρα. Αφού επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό με μειωμένο ορό για 72ώρες, ακολούθησαν 3ώρες με πλήρες θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με UV-C (8J/m²). Δείγματα mRNA συλλέχθηκαν πριν την ακτινοβολήση, και 0.5, 2, 18 και 48 ώρες μετά από την έκθεση στη UV.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 15) απεικονίζεται η μεταβολή στην έκφραση τεσσάρων γονιδίων.

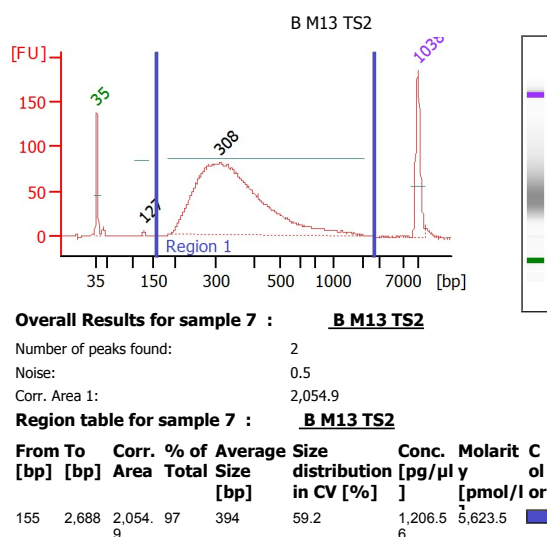


Εικόνα 15 Αποτελέσματα ανάλυσης qPCR. Απεικονίζεται η μεταβολή της έκφρασης τεσσάρων γονιδίων (PODXL, IGF1R, PPP1R8 και MDM2) μετά από την έκθεση των κυττάρων σε υπεριώδη ακτινοβολία, σε φυσιολογικά (VH10) και CS-B (CSB-/-) κύτταρα.

Έχοντας ελέγξει έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων μέσω qPCR, συμπεράναμε ότι η γονιδιακή έκφραση μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών παρουσιάζει μεγάλες διαφορές ακόμα και πριν την έκθεση των κυττάρων σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν γονιδιακές βιβλιοθήκες από τα παραπάνω mRNAs ώστε να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση του DNA και ανάλυση ολόκληρης της γονιδιακής έκφρασης. Ταυτόχρονα, με τον ίδιο τρόπο ποσοτικοποιήθηκε το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των παραπάνω κυττάρων.

Οι cDNA βιβλιοθήκες κατασκευάστηκαν όπως έχει περιγραφεί (Zhong et al., 2013). Κατά την κατασκευή πραγματοποιήθηκαν ποιοτικοί έλεγχοι σε διαφορετικά στάδια, ώστε να βεβαιωθεί η καλή ποιότητα των βιβλιοθηκών.

Εν συντομία, μετά τη σύνθεση του cDNA, δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα, προστέθηκε ουρά αδενίνης και στη συνέχεια επικολλήθηκαν οι ειδικοί Illumina adapters που περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες (indexes). Το DNA των βιβλιοθηκών πολλαπλασιάστηκε με την αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) και το μέγεθος και η ποιότητά τους ελέγχθηκε με τη βοήθεια του Agilent Bioanalyzer (Εικόνα 16).

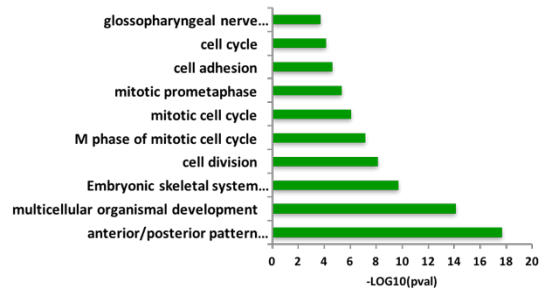


Εικόνα 16 Διάγραμμα απεικόνισης ενός δείγματος που αντιστοιχεί σε cDNA βιβλιοθήκη, με τη χρήση του Bioanalyzer. Όπως φαίνεται, πρόκειται για μία βιβλιοθήκη με μέσο μοριακό βάρος 395 ζεύγη βάσεων, μέγεθος κατάλληλο για αλληλούχιση.

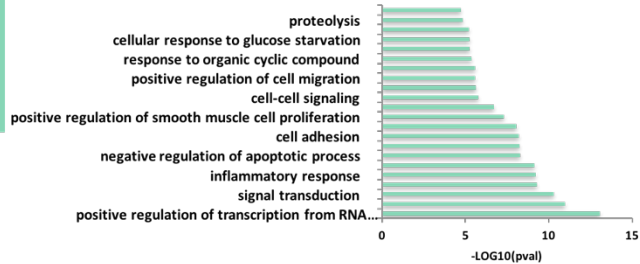
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση είναι φανερό ότι τα φυσιολογικά κύτταρα παρουσιάζουν σημαντικό αριθμό γονιδίων με διαφορετική έκφραση σε σύγκριση με τα κύτταρα CS ασθενών γεγονός που θα μπορούσε να προσφέρει στοιχεία για έναν πιθανό ρόλο της CSB πρωτεΐνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Τα περισσότερα μάλιστα από τα γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα CS-B κύτταρα, βρέθηκε ότι φυσιολογικά εκφράζονται σε εμβρυικά στάδια και αποσιωπώνται στα κύτταρα ενηλίκων ή το αντίθετο (Εικόνα 17). Αυτά τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά για πιθανή συμμετοχή της CSB πρωτεΐνης, άμεση ή έμμεση, στη ρύθμιση της μεταγραφής κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης και διαφοροποίησης.

**Upregulated in
CS-B
GENE ONTOLOGY**



**Downregulated in
CS-B
GENE ONTOLOGY**



Εικόνα 17 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στα CS-B κύτταρα. Απεικονίζονται κατηγορίες γονιδίων που υπερεκφράζονται στα CS-B κύτταρα καθώς και αυτές με μειωμένη έκφραση, σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Καθώς παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ φυσιολογικών και CS κυττάρων, αποφασίσαμε να μελετήσουμε τη ρύθμιση της μεταγραφής πριν και μετά από την έκθεση σε χαμηλές δόσεις υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα φυσιολογικά κύτταρα και να τη συγκρίνουμε με αυτή των CS-B κυττάρων.

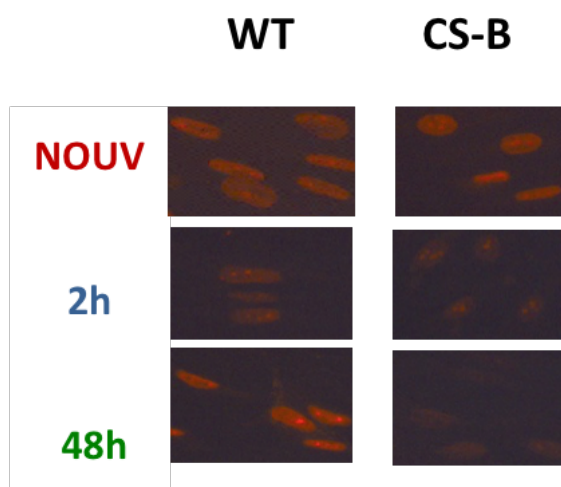
Μελέτη της μεταγραφής

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των CS-B κυττάρων είναι ότι η προσωρινή μείωση της μεταγραφής που παρατηρείται μετά από την έκθεσή των κυττάρων στη UV ακτινοβολία δεν επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από 24 ή 48 ώρες (αναλόγως τη δόση) όπως στα κύτταρα άγριου τύπου, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται σταδιακά σε απόπτωση.

Για να επιβεβαιώσουμε αυτό το χαρακτηριστικό των CS-B κυττάρων στη CS1AN htert κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα διατριβή, ανιχνεύσαμε με ανοσοφθορισμό τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA (nascent, nRNA) σε CS-B και φυσιολογικά κύτταρα, πριν και έπειτα από την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Κατά τη μέθοδο αυτή, πραγματοποιήσαμε σήμανση ζωντανών κυττάρων με ένα ανάλογο ουριδίνης EU (CLK-N002, Jena Bioscience). Πριν τη μονιμοποίησή τους, προστέθηκε 0,1 mM EU στο θρεπτικό υλικό για 2 ώρες. Το EU δεσμεύεται στο νεοσυντιθέμενο RNA (nRNA). Στη συνέχεια με την ειδικότητα της χημείας alexa-fluor 594-azide-EU σημάνθηκαν τα μόρια του RNA που περιείχαν το EU, 2 και 48 ώρες μετά από την έκθεση στη UV και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Στα CS-B κύτταρα, η σύνθεση νέου RNA φαίνεται μειωμένη 2 ώρες μετά από την έκθεση στη UV ακτινοβολία, όπως και στα φυσιολογικά κύτταρα. Όμως, δύο ημέρες αργότερα (48 h), όταν όλες οι βλάβες αναμένεται να έχουν επιδιορθωθεί μέσω του TC-NER μηχανισμού, η μεταγραφή επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που δεν παρατηρείται στα CS-B κύτταρα (Εικόνα 18), όπου ο TC-NER μηχανισμός δεν λειτουργεί. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τις έως τώρα δημοσιευμένες μελέτες.



Εικόνα 18 Παρατήρηση του nRNA σε μικροσκόπιο φθορισμού, έπειτα από σήμανση με EU. Στα φυσιολογικά κύτταρα παρατηρείται συνολική μείωση του σήματος 2 ώρες μετά την επίδραση UV και αποκατάσταση του σήματος 24 ώρες μετά. Στα κύτταρα CS-B η μείωση του σήματος παραμένει σταθερή 24 ώρες μετά από την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Μπάρα κλίμακας: 20μm

Μελέτη των διαφορετικών σταδίων της μεταγραφής

Οι παρατηρούμενες διαφορές ως προς τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές, μας οδήγησε στην εκτενή μελέτη της διαδικασίας της μεταγραφής, προκειμένου να εξηγήσουμε τον παρατηρούμενο φαινότυπο.

Επιλογή μεθόδων

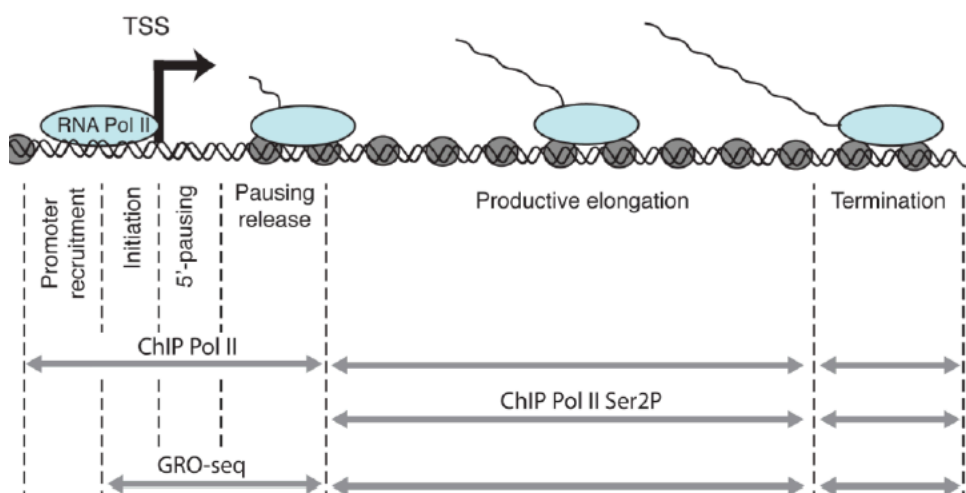
Για τη μελέτη των επιμέρους σταδίων της μεταγραφής είναι πολύ κρίσιμο να επιλεγθούν οι κατάλληλες μέθοδοι.

Η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με το αντίσωμα της RNAPII (RNAPII CHIP-seq) είναι μία πολύ διαδεδομένη μέθοδος. Με την ανίχνευση της πρόσδεσης της RNAPII στις γονιδιακές περιοχές είναι δυνατόν να υπολογιστεί και η συχνότητα της μεταγραφής. Ωστόσο η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται πολύ από την ποιότητα του αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, το CHIP-seq με αντισώματα που αναγνωρίζουν όλες τις μορφές της RNAPII, ανεξαρτήτως φωσφορυλίωσης, δεν παρέχει σαφείς πληροφορίες για τα επιμέρους στάδια της μεταγραφής (Ferrari et al., 2013).

Για τον λόγο αυτό στην παρούσα διατριβή τα στάδια της μεταγραφής αρχικά μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για τις διαφορετικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της RNAPII που είναι γνωστές σε κάθε στάδιο. Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της προ-εναρκτήριας πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την υποφωσφορυλιωμένη RNAPII (Hypo-), για την πολυμεράση έναρξης αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 5 RNAPII (Ser5P-) και για την πολυμεράση επιμήκυνσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 2 RNAPII (Ser2P-, Εικόνα 19). Με τον τρόπο αυτόν διαχωρίστηκαν τα διαφορετικά στάδια της μεταγραφής (Buratowski, 2009).

Στη συνέχεια η μελέτη επικεντρώθηκε στην ενεργή μεταγραφή (φάση επιμήκυνσης). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την CHIP-seq ανάλυση για τη φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 2 RNAPII, μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε το προφίλ πρόσδεσης της RNAPII (Ser2P) σε γενωμικό επίπεδο. Στη συνέχεια, για να μπορέσουμε να διαχωρίσουμε τις πολυμεράσες επιμήκυνσης που μεταγράφουν ενεργά τη στιγμή του πειράματος από αυτές που βρίσκονται στη χρωματίνη σε κατάσταση αναμονής στις βλάβες (stalled), προχωρήσαμε στην τεχνική αλληλούχισης νεοσυντιθέμενων RNAs με τη μέθοδο Global run-on sequencing

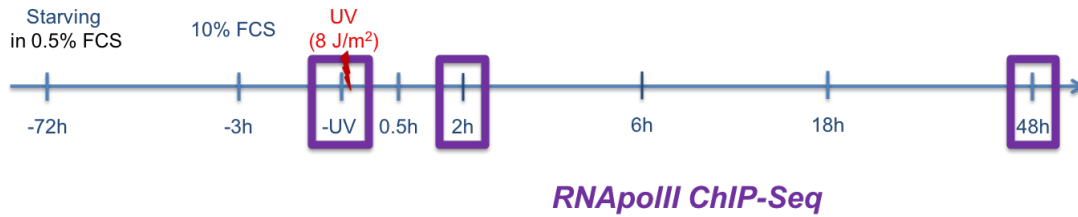
(Gro-seq, Core et al., 2008, Υλικά και Μέθοδοι). Η τεχνική αυτή δεν εξαρτάται από κανένα αντίσωμα και ανιχνεύει την ακριβή θέση και την πυκνότητα μόνο των ενεργών RNA πολυμερασών επιμήκυνσης. Ο συνδυασμός της μεθόδου αυτής με την RNAPII-Ser2P ChIP-seq μεθοδολογία μας δίνει και τη θέση των σταματημένων πολυμερασών, κατά το ακριβές χρονικό πλαίσιο του πειράματος (Εικόνα 19).



Εικόνα 19 τροποποιημένη από (Ferrari et al., 2013). Χρήση διαφορετικών μεθόδων για τη μελέτη των διαφορετικών σταδίων της μεταγραφής. Η ChIP-seq ανιχνεύει τις RNA πολυμεράσες σε όλο το μήκος του γονιδίου, μη διαχωρίζοντας το στάδιο στο οποίο βρίσκονται. Η ChIP-seq για τη φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 2 πολυμεράση αναλυεί τις περιοχές που μεταγράφονται ενεργά (φάση επιμήκυνσης), χωρίς όμως να πληροφορεί για τις σταματημένες RNAPII. Τέλος η Gro-seq δίνει την πραγματική εικόνα της μεταγραφής τη χρονική στιγμή του πειράματος.

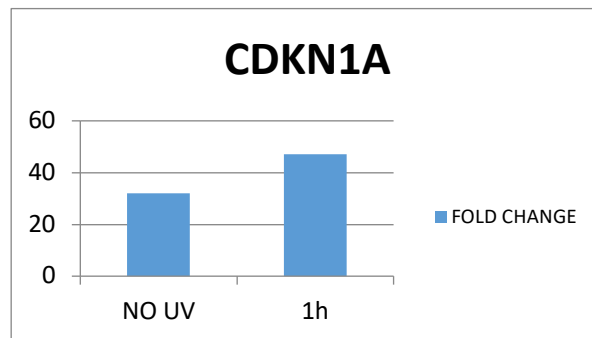
Μελέτη σύνδεσης RNAPII στη χρωματίνη (ChIP)

Πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με το αντίσωμα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη2 RNAPII σε φυσιολογικά κύτταρα και σε κύτταρα CS-B ασθενών πριν και σε διαφορετικούς χρόνους μετά από την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας, όπως απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 20). Τα κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών είχαν προηγουμένως συγχρονιστεί στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό με χαμηλή περιεκτικότητα σε ορό και στη συνέχεια είχαν αφεθεί να εισέλθουν συγχρονισμένα στη φάση G1 μετά από επώαση τους για 3 ώρες σε θρεπτικό υλικό με υψηλή περιεκτικότητα σε ορό.



Εικόνα 20 Για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με το αντίσωμα της RNAPII τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με μειωμένο ορό για 72ώρες. Αυτό εξασφάλισε τον συγχρονισμό τους στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια χορηγήθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό για 3ώρες. Έτσι τα περισσότερα κύτταρα τη στιγμή της έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία βρίσκονταν στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Στις 2 και στις 48 ώρες μετά την ακτινοβολία τα κύτταρα υπέστησαν χημική διασύνδεση (crosslinking) και ακολούθησε η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης. Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε φυσιολογικά κύτταρα, καθώς και σε κύτταρα CS-B ασθενών.

Στη συνέχεια απομονώθηκε το κατακρημνισμένο DNA και σε ένα μέρος αυτού πραγματοποιήθηκε qPCR με τη χρήση εκκινητών για επιλεγμένα γονίδια - μάρτυρες ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα του πειράματος. Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα για το γονίδιο *CDKN1A* (Εικόνα 21). Η *CDKN1A* πρωτεΐνη έχει φανεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο κατά τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση. Παρατηρήσαμε ότι στα φυσιολογικά κύτταρα η πρόσδεση της RNAPII στον υποκινητή του *CDKN1A* γονιδίου είναι ενισχυμένη κατά 20 φορές μετά την ακτινοβολία, υποδηλώνοντας πιθανά την αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου αυτού μετά την επαγωγή βλαβών.



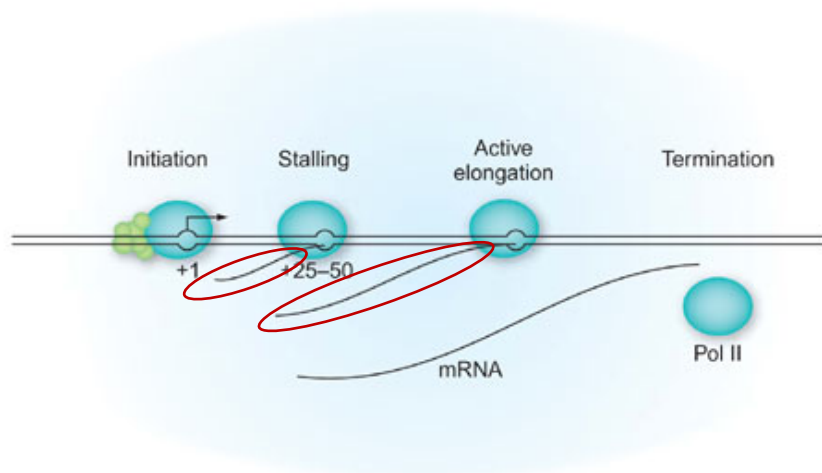
Εικόνα 21 Ανάλυση της αλυσιδωτής αντίδρασης της RNA πολυμεράσης με εκκινητή του *CDKN1A* γονιδίου, στα φυσιολογικά κύτταρα, πριν και μία ώρα μετά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Παρατηρείται ενισχυμένη πρόσδεση της RNAPII στο συγκεκριμένο γονίδιο, μία ώρα μετά την ακτινοβολία.

Αφού ελέγχθηκε η ειδικότητα του ChIP υλικού, κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες (Υλικά και Μέθοδοι), οι οποίες απεστάλησαν για αλληλούχιση έπειτα από επιπλέον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο.

Απομόνωση νεοσυντιθέμενου RNA (nascent RNA-nRNA)

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, προκειμένου να διερευνηθεί η άμεση απόκριση των κυττάρων σε βλάβες DNA στο επίπεδο της μεταγραφής, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των nRNAs, βασιζόμενη στην Gro-seq τεχνική. Στα RNAs αυτά δεν έχει προλάβει να προστεθεί η πολυαδενινική ουρά και να ολοκληρωθεί η ωρίμανση.

Η επιλογή του nRNA έγινε όπως και παραπάνω με την επώαση των κυττάρων με το ανάλογο ουριδίνης EU (100μM) για τα τελευταία 5 λεπτά πριν την συλλογή του ολικού RNA. Μετά τη συλλογή του ολικού RNA επιλέχθηκαν μόνο τα μόρια RNA που περιείχαν EU. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την ειδικότητα της χημείας biotinyne-azide -EU κάνοντας χρήση του πακέτου Click-iT™ (Εικόνα 22). Τέλος κατασκευάστηκαν οι cDNA βιβλιοθήκες και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση.



Εικόνα 22 τροποποιημένο από (Tatkun, 2007) Απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων της μεταγραφής και των nascent RNAs. Με κόκκινο κύκλο επισημαίνονται τα είδη των RNAs που επιλέγονται με την απομόνωση των nRNA.

Απόκριση των φυσιολογικών κυττάρων στην UV ακτινοβολία

Καθώς οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της μεταγραφής ως απάντηση σε UV-επαγόμενες βλάβες δεν ήταν σαφείς ούτε για τα φυσιολογικά κύτταρα, αποφασίσαμε να προσδιορίσουμε τις αλλαγές στη ρύθμιση της μεταγραφής στα φυσιολογικά κύτταρα και στη συνέχεια να τα συγκρίνουμε με αυτές των CS-B κυττάρων.

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν και αφορούν την απόκριση των φυσιολογικών κυττάρων σε βλάβες, δημοσιεύθηκαν στο περιοδικό Nature Communications (volume 8, Article number: 2076 (2017) doi:10.1038/s41467-017-02145-4):

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

Matthieu D. Lavigne, Dimitris Konstantopoulos*, Katerina Z. Ntakou-Zamplara*, Anastasios Liakos & Maria Fousteri

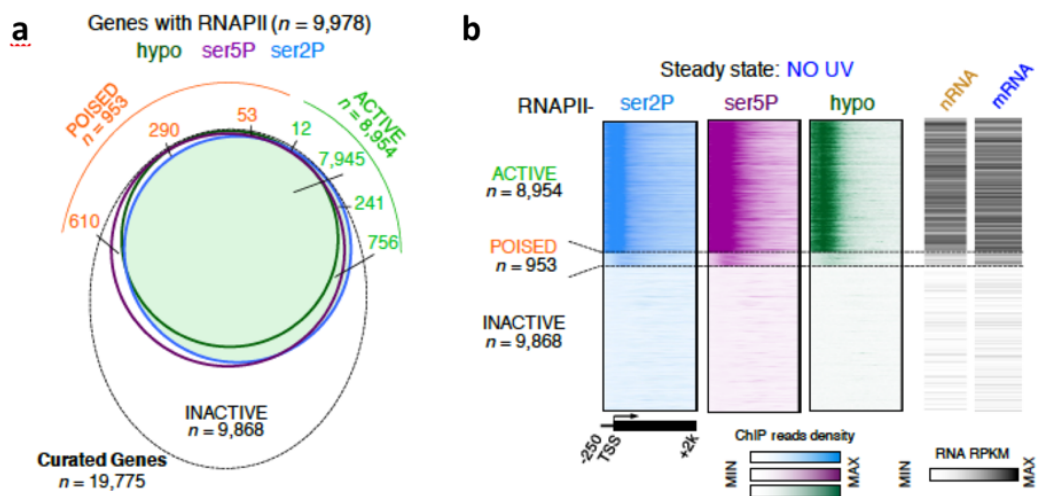
(*equal contribution).

Η UV ακτινοβολία δίνει το έναυσμα στις RNA πολυμεράσες II να ξεκινήσουν την επιμήκυνση της μεταγραφής, στα ενεργά γονίδια.

Προσδιορισμός ενεργών, σε αναμονή και ανενεργών γονιδίων

Για τη μελέτη των φυσιολογικών κυττάρων αρχικά προσδιορίστηκε η κατάσταση των διάφορων γονιδίων (ενεργά, σε αναμονή και ανενεργά). Αυτό έγινε με τη βοήθεια ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις διάφορες ισομορφές της RNA πολυμεράσης II, Προ-εναρκτήρια- υποφωσφορυλιωμένη RNAPII, εναρκτήρια-φωσφορυλιωμένη στη σερίνη5, από το TSS έως το PPP, επιμήκυνσης-φωσφορυλιωμένη στη σερίνη2, μετά το PPP.

Η κατάσταση των γονιδίων προσδιορίστηκε στη φυσιολογική κατάσταση (NO UV) με ανάλυση του σήματος κάθε πειράματος στην ευρύτερη περιοχή κοντά στους υποκινητές. Συνολικά και για τις τρεις ισομορφές της RNA πολυμεράσης II, ανιχνεύθηκε σήμα σε 9.978 γονίδια. Τα γονίδια που περιείχαν την RNAPII-ser2P (Εικόνα 23- μπλε χρώμα) θεωρήθηκαν ενεργά. Αυτά υπολογίστηκαν στον αριθμό 8.954. Τα υπόλοιπα γονίδια με σήμα της RNAPII-ser5P (μοβ χρώμα) και της υποφωσφορυλιωμένης πολυμεράσης (ηγρο, σκούρο πράσινο χρώμα), τα οποία όμως δεν είχαν σήμα της RNAPII-ser2P, θεωρήθηκαν σε αναμονή (poised) και ήταν 953. Τα γονίδια στα οποία δεν ανιχνεύτηκε σήμα σε κανένα από τα παραπάνω CHIP-seq, θεωρήθηκαν ανενεργά και ήταν 9.868. Τα επίπεδα του nRNA και του mRNA σε φυσιολογικές συνθήκες συμφωνούσαν με την κατανομή της RNA πολυμεράσης II στο γονιδίωμα.

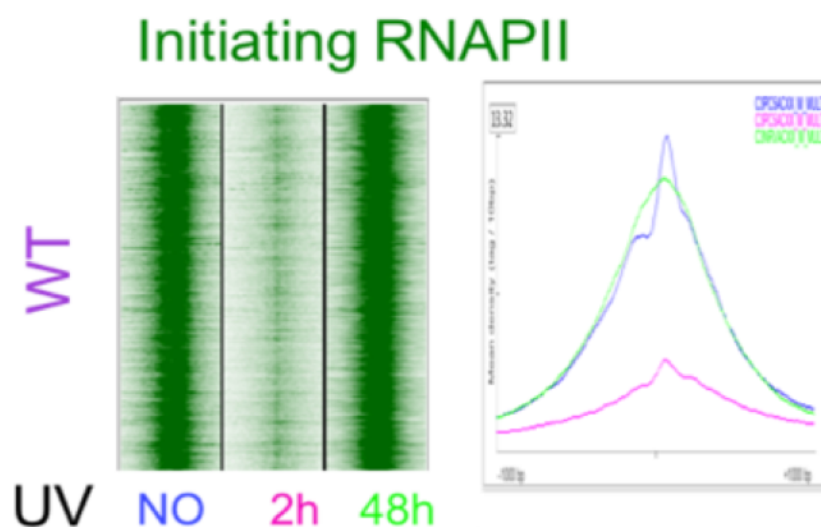


Εικόνα 23 α. Τα γονίδια με σήμα για τις διαφορετικές ισομορφές της RNA πολυμεράσης II, έπειτα από ChIP-seq ανάλυση. Σκούρο πράσινο: υποφωσφορυλιωμένη RNAPII (hypo), μοβ: φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 5 (ser5P) και μπλε: φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 2 (ser2P). Ενεργά γονίδια (active-ανοιχό πράσινο): σήμα και στις τρεις ισομορφές. Γονίδια σε αναμονή (poised-πορτοκαλί): σήμα μόνο hypo και ser5P. **β.** Σχηματική απεικόνιση της πυκνότητας του μέσου σήματος για τις παραπάνω ισομορφές της RNAPII στις περιοχές κοντά (-250bp έως +2Kb) στα σημεία έναρξης της μεταγραφής (TSS). Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο. Τα γονίδια είναι διατεταγμένα ανάλογα με την κατάσταση της έκφρασής τους που προσδιορίστηκε στο α. Παρατίθεται το σήμα του nRNA και του mRNA για τα ίδια γονίδια, υπό φυσιολογικές συνθήκες (NO UV).

Έναρξη της μεταγραφής

Με σκοπό να βεβαιώσουμε σε γενωμικό επίπεδο ότι, η έναρξη της μεταγραφής επηρεάζεται από την επίδραση της UV ακτινοβολίας (Εικόνα 18, πειράματα ανοσοφθορισμού), πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με αντίσωμα για την RNAPII στο στάδιο της προ-έναρξης (υποφωσφορυλιωμένη) πριν και έπειτα από 2 και 48 ώρες μετά την έκθεση (ChIP-seq).

Σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω, παρατηρήσαμε ότι η υποφωσφορυλιωμένη RNAPII μειώνεται σημαντικά 2 ώρες μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Βρέθηκε ότι η έναρξη της μεταγραφής αποκαθίσταται στα φυσιολογικά επίπεδα, 48 ώρες μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος της μη φωσφορυλιωμένης (εναρκτήριας) RNA πολυμεράσης II πριν και μετά την επίδραση UV ακτινοβολίας σε φυσιολογικά (WT) και κύτταρα CS ασθενών (CSB). Το σήμα σύνδεσης της RNAPII κοντά στα σημεία έναρξης της μεταγραφής (Transcription Starting Site-TSS) πέφτει 2ώρες μετά την ακτινοβολία και επανέρχεται και στις δύο κυτταρικές σειρές 48ώρες αργότερα.

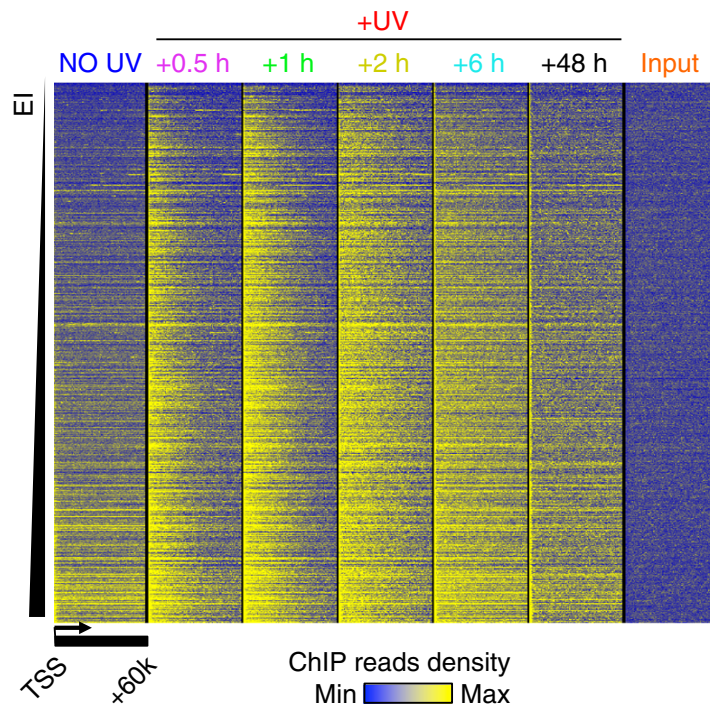
Εξαιτίας αυτού του αποτελέσματος, οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι ενδεχομένως η μη αποκατάσταση της μεταγραφής στα CS-B κύτταρα δεν οφείλεται σε απορρύθμιση στο στάδιο της έναρξης. Κατά συνέπεια, αποφασίσαμε να μελετήσουμε και τα επόμενα στάδια της μεταγραφής.

Μελέτη της επιμήκυνσης της μεταγραφής (RNAPII-ser2P ChIP-seq)

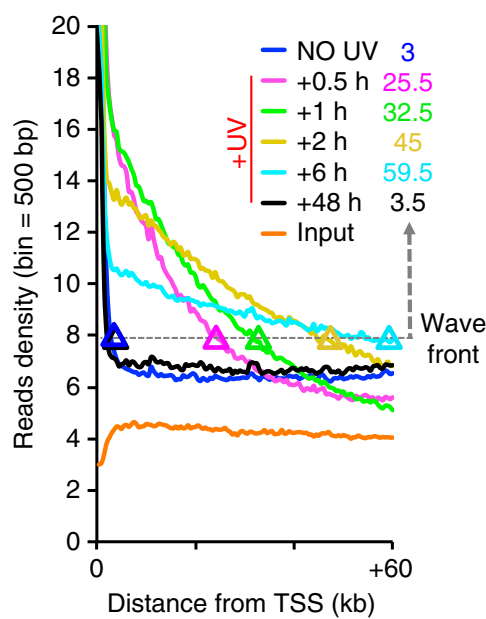
Προκειμένου να μελετηθεί το πώς επηρεάζονται οι μοριακοί μηχανισμοί της επιμήκυνσης της μεταγραφής μετά από στρες, πραγματοποιήθηκαν λεπτομερείς αναλύσεις του σήματος της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 2 RNA πολυμεράσης II, καθώς και αυτού της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 5 RNAPII. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ChIP-seq σε κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποβληθεί σε UV ακτινοβολία και σε UV ακτινοβολημένα κύτταρα, έπειτα από 0.5, 1, 2, 6 και 48 ώρες ανάκαμψης. Βρέθηκε ότι το στρες που προκαλείται από χαμηλές δόσεις UV-C ακτινοβολίας προκαλεί σημαντική αναδιοργάνωση της μεταγραφής (Εικόνα 25, Εικόνα 26).

Όπως ήταν ήδη γνωστό, τα συνολικά επίπεδα της μεταγραφής μειώνονται δραματικά 2 ώρες μετά από έκθεση στη UV ακτινοβολία. Ωστόσο η μεγάλη ευαισθησία της μεθοδολογίας αυτής μας επέτρεψε να ανιχνεύσουμε την αύξηση των πολυμερασών επιμήκυνσης (RNAPII-ser2P) στο εσωτερικό των γονιδίων σε συγκεκριμένες περιοχές στα

αρχικά χρονικά στάδια μετά την ακτινοβόληση. Οι περιοχές αυτές εντοπίστηκαν στο 5' άκρο μετά τα σημεία έναρξης της μεταγραφής (TSS) (Εικόνα 25, Εικόνα 26).

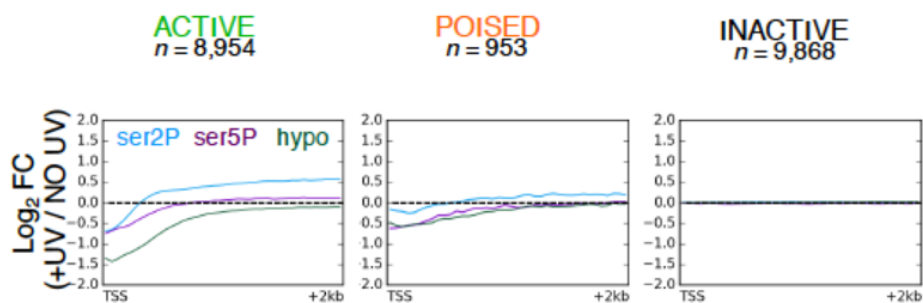


Εικόνα 25 Σχηματική κατηγοριοποίηση (Heatmap) που απεικονίζει την πυκνότητα της RNAPII-ser2P από τα TSS έως +60 kb μετά τα TSS, πριν και μετά από επίδραση UV ακτινοβολίας. Κάθε γραμμή απεικονίζει ένα ενεργό γονίδιο. Τα γονίδια είναι μεγαλύτερα των 60kb και έχουν ταξινομηθεί με βάση το Ei, όπως υπολογίστηκε πριν από την επίδραση της UV ακτινοβολίας.



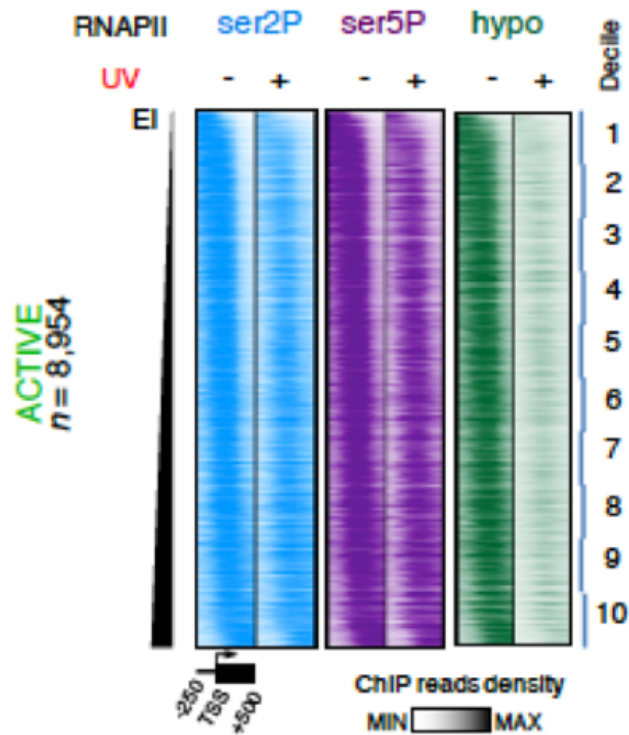
Εικόνα 26 Διάγραμμα ποσοτικοποίησης του παραπάνω Heatmap. Απεικονίζεται η προσχώρηση του αρχικού μετώπου (wave front) των νέων κυμάτων επιμήκυνσης στο εσωτερικό των γονιδίων, έπειτα από την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα, υπολογίστηκε ο λόγος των διαβασμάτων της RNAPII μεταξύ των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων προς αυτά των υποκινητών. Ο παραπάνω λόγος ονομάστηκε Escape Index (EI). Παρατηρήσαμε ότι ο EI αυξήθηκε σημαντικά ($\Delta EI > 1$) στα αρχικά χρονικά σημεία μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας (0.5 έως 2 ώρες) στο μεγαλύτερο ποσοστό των ενεργών γονιδίων (έως 90.6%) για την RNAPII-ser2P και την RNAPII-ser5P. Αντιθέτως, στα εν αναμονή γονίδια παρατηρήθηκαν μικρές αλλαγές, ενώ στα ανενεργά που δεν μεταγράφονταν πριν την έκθεση στην UV ακτινοβολία δεν παρατηρήθηκε αναδιοργάνωση του μεταγραφικού τους προφίλ (Εικόνα 27). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποσαφήνισαν το γενικό προφίλ της RNAPII, όπως αυτό έχει περιγραφεί (Gyenis et al., 2014).



Εικόνα 27 Γενική αναδιοργάνωση της κατανομής των ισομορφών της RNAPII κατά την απόκριση στη UV ακτινοβολία. Διαγράμματα ποσοτικοποίησης της μέσης πυκνότητας του σήματος μετά από την ακτινοβολία, σε σύγκριση με τη φυσιολογική κατάσταση. ($\text{Log}_2 \text{FC} = (\text{πυκνότητα διαβασμάτων} + \text{UV}) / (\text{πυκνότητα διαβασμάτων NO UV})$).

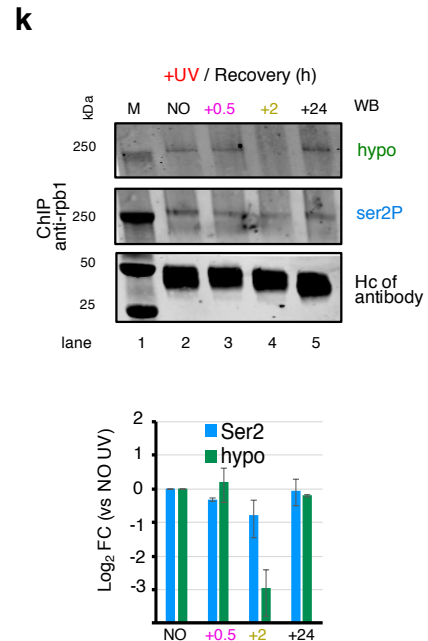
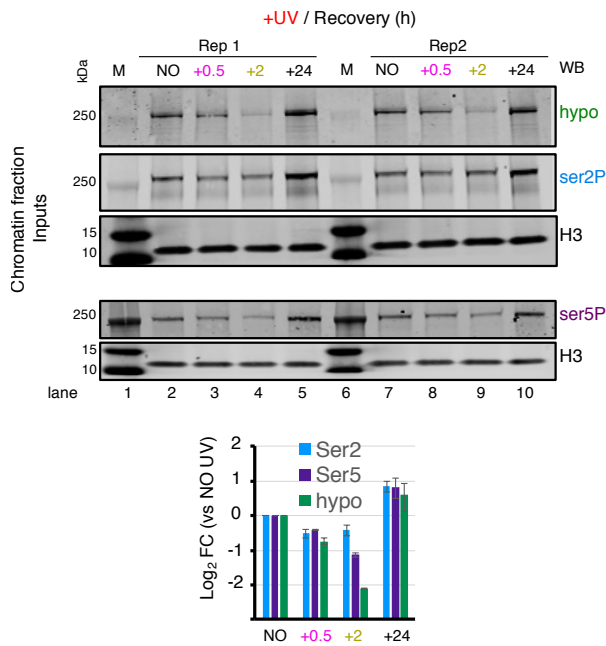
Στη συνέχεια υποθέσαμε ότι η αύξηση στο EI οφείλεται στη μετάβαση των πολυμερασών από το PPP στην επιμήκυνση. Την υπόθεση αυτή ενίσχυσε το γεγονός της ταυτόχρονης μείωσης των RNAPII-ser2P και RNAPII-ser5P στις περιοχές κοντά στους υποκινητές (-250 έως +100 ζεύγη βάσεων από τα TSS) και της αύξησής τους στο εσωτερικό των γονιδίων (+100 έως 2000 ζεύγη βάσεων από τα TSS), ιδιαιτέρως της RNAPII-ser2P. Αντίθετα, η υποφωσφορυλιωμένη RNAPII μειώνεται μεν στους υποκινητές, αλλά δεν αυξάνεται στο εσωτερικό των γονιδίων (Εικόνα 28).



Εικόνα 28 Σχηματική κατηγοριοποίηση (heatmap) της κατανομής των διαφορετικών ισομορφών της RNAPII πριν (-) και μετά (+) την ακτινοβολία (8 J/m^2). Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει την PPP περιοχή όλων των ενεργών γονιδίων (-250 bp; +500 bp από το TSS). Τα γονίδια στοιχίζονται με αυξανόμενο EI.

Συνολικά, η παραπάνω ανακατανομή της RNA πολυμεράσης γύρω από τους υποκινητές υποστηρίζει μία γενικευμένη και ταυτόχρονη απελευθέρωση πολυμερασών επιμήκυνσης της μεταγραφής από τις θέσεις παύσης πλησίον των υποκινητών –PPP όλων των ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων, οι οποίες προχωρούν ως μεταγραφικά κύμματα από το 5' προς το 3' άκρο των γονιδίων.

Οι αλλαγές στα ισομερή της RNAPII αναλύθηκαν επίσης με τη μέθοδο Western Blot, σε δείγματα χρωματίνης με ή χωρίς ανοσοκατακρήνιση με το αντίσωμα της προ-εναρκτήριας πολυμεράσης (Hypo-RNAPII). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα συνολικά επίπεδα της προ-εναρκτήριας RNA πολυμεράσης II (Hypo-RNAPII) μειώθηκαν σημαντικά (κατά 75%) 2 ώρες μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των πολυμερασών επιμήκυνσης, ενώ μικρή μείωση παρατηρήθηκε και στην Ser5P-RNAPII (Εικόνα 29).

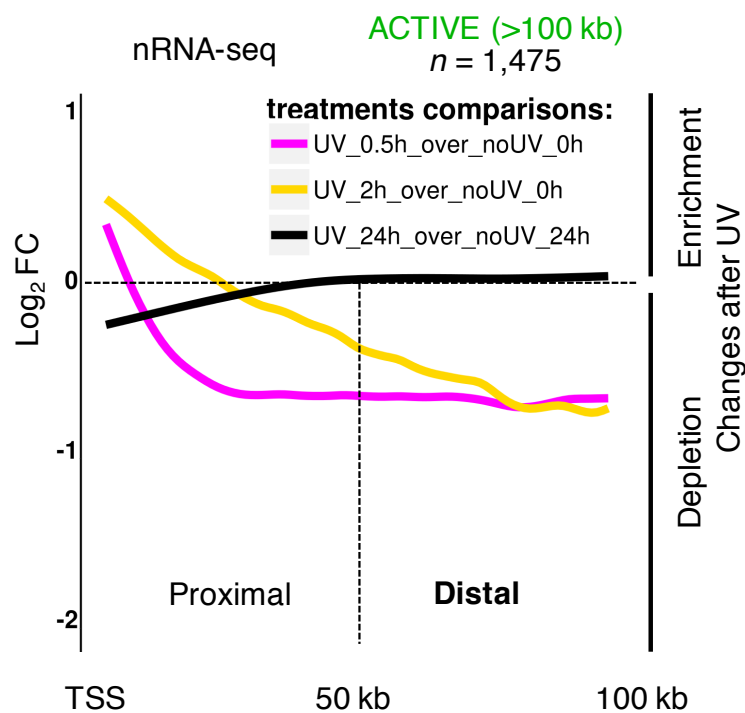


Εικόνα 29 Western blot ανάλυση χωρίς (inputs) και μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με το αντίσωμα για τη συνολική RNAPII (ChIP anti-rpb1). Τα αρχικά επίπεδα των ισομορφών της RNAPII επανέρχονται 24ώρες μετά τη UV ακτινοβολία. (Η ιστόνη H3 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας στα inputs και η μεγάλη υπομονάδα του αντι σώματος (Hc-heavy chain) στα ChIPs).

Συμπερασματικά, στα αρχικά στάδια απόκρισης στην υπεριώδη ακτινοβολία, η εισροή των πολυμερασών επιμήκυνσης στο εσωτερικό των γονιδίων προκύπτει από τη μετατροπή των προ-εναρκτήριων πολυμερασών (υποφωφορυλιωμένη RNAPII του προ-εναρκτήριου συμπλόκου-PIC) σε ισόμορφα έναρξης (ser5P), και στη συνέχεια επιμήκυνσης (ser2P).

Μελέτη της επιμήκυνσης της μεταγραφής (nRNA-seq)

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, μέτρηση των επιπέδων του νεοσυντιθέμενου RNA (nascent-nRNA) στις περιοχές μετά τα PPP, μεταξύ 0.5 και 2 ωρών έπειτα από την επίδραση της UV, έδειξε ότι είναι αυξημένα. Η αύξηση αυτή εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές αυτές, ενώ τα επίπεδα του νεοσυντιθέμενου RNA σε περιοχές πιο απομακρυσμένες από το 5' άκρο παρουσιάζουν μία γενική μείωση. (Εικόνα 30).



Εικόνα 30 Μελέτη των αλλαγών στο νεοσυντιθέμενο RNA (nRNA) μετά από την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Διαγραμματική απεικόνιση της μέσης πυκνότητας nRNA σε γονίδια μεγαλύτερα των 100kb, από τα TSS έως +100kb μετά τα TSS. Στα αρχικά στάδια μετά την UV (0.5 έως 2 ώρες), το nRNA παρουσιάζει αύξηση στις περιοχές κοντά στο 5' άκρο και μείωση στο εσωτερικό των γονιδίων και προς στο 3' άκρο. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται σύγκριση με τον μάρτυρα χωρίς την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί από τη μείωση της ταχύτητας των νέων κυμάτων επιμήκυνσης καθώς αυτά μετακινούνται στο εσωτερικό των γονιδίων, και συναντούν όλο και περισσότερες βλάβες στο DNA. Τελικά, 24 ώρες μετά από την επίδραση της UV ακτινοβολίας τα EI, τα επίπεδα της RNA πολυμεράσης II καθώς και του nRNA επανέρχονται στα αρχικά, αφού έχουν διορθωθεί όλες οι βλάβες. Συνεπώς έπειτα από διόρθωση όλων των βλαβών, τα επίπεδα της μεταγραφής επανέρχονται στα φυσιολογικά.

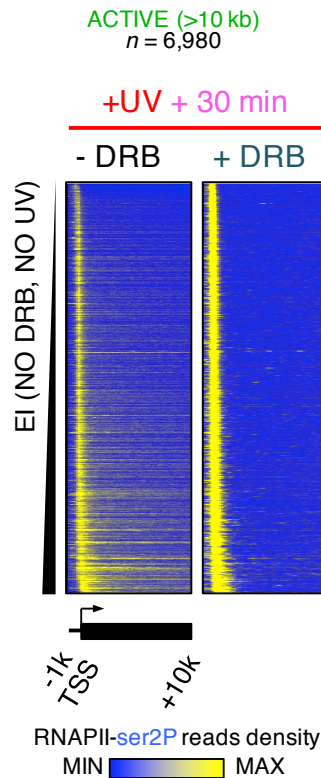
Σημείο ελέγχου PPP

Όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή, όταν η φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 5 πολυμεράση φτάσει στα +30 έως στα +50 νουκλεοτίδια από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS), συχνά σταματά σε περιοχές που ονομάζονται θεύσεις παύσης πλησίον του υποκινητή, Proximal Promoter Pausing Sites (PPP). Η επιμήκυνση της μεταγραφής ξεκινά με την απελευθέρωση της RNA πολυμεράσης II από το PPP και εξαρτάται από διάφορα αναπτυξιακά ή περιβαλλοντικά σήματα.

Η έκθεση των κυττάρων σε μεταλλαξογόνους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία πιθανώς διαταράσσει τη φυσιολογική ροή της μεταγραφής, και πιο συγκεκριμένα το σημείο ελέγχου PPP. Ενδεχομένως η ρύθμιση που επιτελείται από τα PPP και που φυσιολογικά αποτελούν σημεία ελέγχου της μεταγραφής, να παρακάμπτονται προσωρινά.

Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή, τα επίπεδα της RNAPII που εμφανίζονται προσδεδεμένα στο εσωτερικό των γονιδίων μετά από την έκθεση σε UV διαφέρουν από τα φυσιολογικά. Η μείωση της RNAPII στα σημεία πριν τις PPP είναι φανερή σε όλα τα γονίδια και είναι μάλιστα πιο έντονη στα γονίδια που εκφράζονται λιγότερο. (Εικόνα 25 : πιο ομοιόμορφο κίτρινο σήμα στα γονίδια με χαμηλό EI). Συμπερασματικά, μετά από στρες ο παραπάνω μηχανισμός επιτρέπει την άμεση απελευθέρωση μορίων RNAPII από τις περιοχές PPP, ακόμα και σε γονίδια που φυσιολογικά μεταγράφονται σε χαμηλά επίπεδα.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μαζική απελευθέρωση της RNA πολυμεράσης συμβαίνει εκ νέου (*de novo*) από τα σημεία PPP, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole), ο οποίος δεν επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της Ser2 και κατά συνέπεια την απελευθέρωση της RNAPII από τα PPP. Η αναστολή αυτή είναι αναστρέψιμη. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τον αναστολέα DRB κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησής τους αλλά και στο αμέσως επόμενο χρονικό πλαίσιο (30 λεπτά). Η χρήση του αναστολέα δεν επέτρεψε την απελευθέρωση νέων κυμάτων επιμήκυνσης και αυτό επιβεβαιώθηκε από τη δραματική μείωση των RNAPII που απελευθερώθηκαν από τις PPP περιοχές μισή ώρα μετά την ακτινοβόληση (Εικόνα 31).



Εικόνα 31 Χαρακτηρισμός του σχετιζόμενου με τη UV ακτινοβολία προφίλ της μεταγραφής, μετά από τη χρήση του αναστολέα DRB. α. Heatmaps που απεικονίζουν την κατανομή της RNAPII-ser2P στα ενεργά γονίδια μεγαλύτερα των 10 kb σε απόσταση -1kb έως +10kb από το TSS. Μετά από έκθεση σε 20 J/m² UV ακτινοβολία παρουσία (+) είτε απουσία (-) του αναστολέα DRB. Τα γονίδια είναι τοποθετημένα με αυξανόμενη τιμή EI (όπως και στο προηγούμενο heatmap).

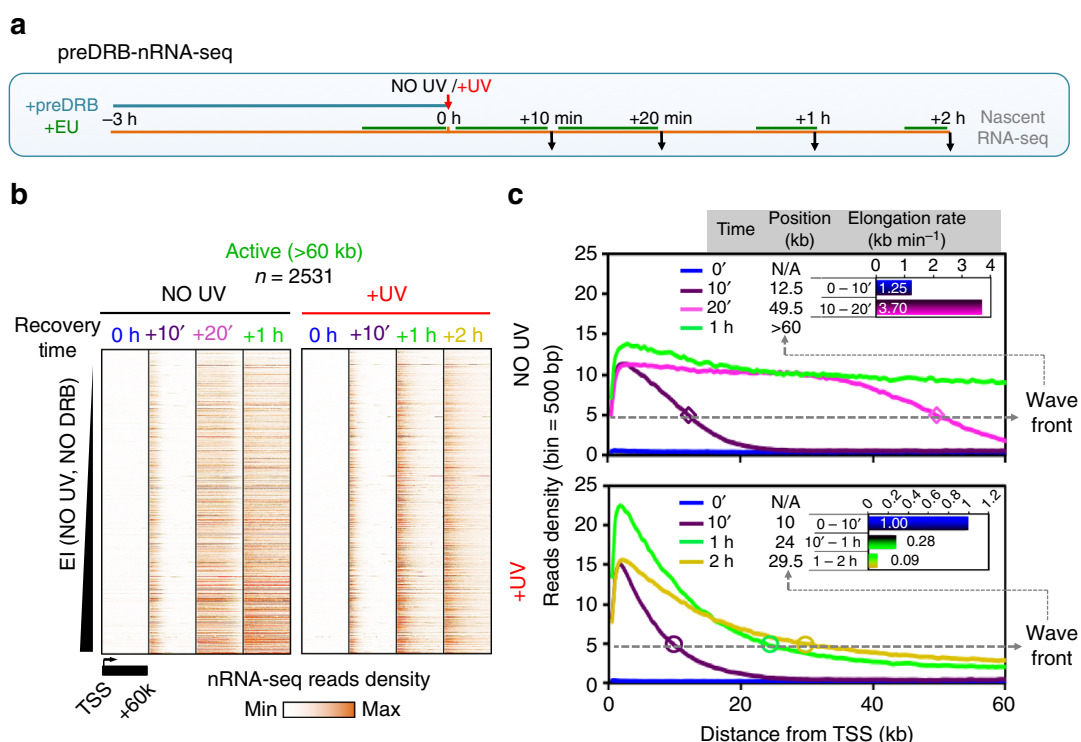
Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα νέα μόρια των RNA πολυμερασών που απελευθερώνονται από τα PPP, αποκρινόμενα στη UV ακτινοβολία (Εικόνα 32). Για να μελετηθούν αυτά και να αποκλειστούν οι RNAPII-ser2P που ήδη πραγματοποιούσαν επιμήκυνση της μεταγραφής πριν ή κατά την έκθεση στη UV, τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα DRB πριν την έκθεση στη UV. Παραμένοντας για 3 ώρες παρουσία του αναστολέα, όλοι οι κύκλοι μεταγραφής θα είχαν ολοκληρωθεί για τα ήδη μεταγραφόμενα γονίδια (μεγέθους μέχρι 800 Kb), ενώ δεν θα ήταν δυνατόν να ξεκινήσουν νέες RNAPII από τα PPP. Με τον τρόπο αυτόν ελαχιστοποιήθηκε ο αριθμός των ενεργά επιμηκούμενων RNAPII-ser2P και του νεοσυντιθέμενου RNA που θα μπορούσαν να ανιχνευτούν. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο αναστολέας και σημάνθηκε το νεοσυντιθέμενο RNA (nRNA), όπως έχει ήδη περιγραφεί. Τα κύτταρα, τα οποία δεν εκτέθηκαν στη UV ακτινοβολία ξεκίνησαν άμεσα τη μεταγραφή στα φυσιολογικά για αυτά επίπεδα.

Σε συμφωνία με την αρχική μας παρατήρηση αλλά και με μία πρόσφατη έρευνα (Williamson et al., 2017), στα κύτταρα που εκτέθηκαν στη UV ακτινοβολία, η απελευθέρωση

νέων πολυμερασών από το PPP δεν επηρεάστηκε. Παρά την προηγούμενη έκθεση στον αναστολέα, η UV ακτινοβολία προκάλεσε την απελευθέρωση ενός νέου κύματος μεταγραφής στο εσωτερικό όλων των ενεργών γονιδίων, παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στα κύτταρα που δεν είχαν επωαστεί με τον αναστολέα. Επομένως η UV ακτινοβολία δεν αποτρέπει την απελευθέρωση νέων πολυμερασών επιμήκυνσης που βρίσκονται σε αναμονή (poised) στο PPP.

Ο ρυθμός της επιμήκυνσης αυτού του νέου κύματος μεταγραφής μειώνεται κατά τη διάρκεια αποκατάστασης από τη UV ακτινοβολία σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες, προφανώς λόγω της αναστολής των πολυμερασών που συναντούν βλάβες στο μεταγραφόμενο DNA. Η μείωση αυτή της ταχύτητας μεταγραφής εξηγεί και τη μείωση του νεοσυντιθέμενου RNA που ανιχνεύεται στις απομακρυσμένες από το 5' περιοχές των γονιδίων καθώς και στα πειράματα ανοσοφθορισμού μετά από σήμανση nRNA (Εικόνα 30).

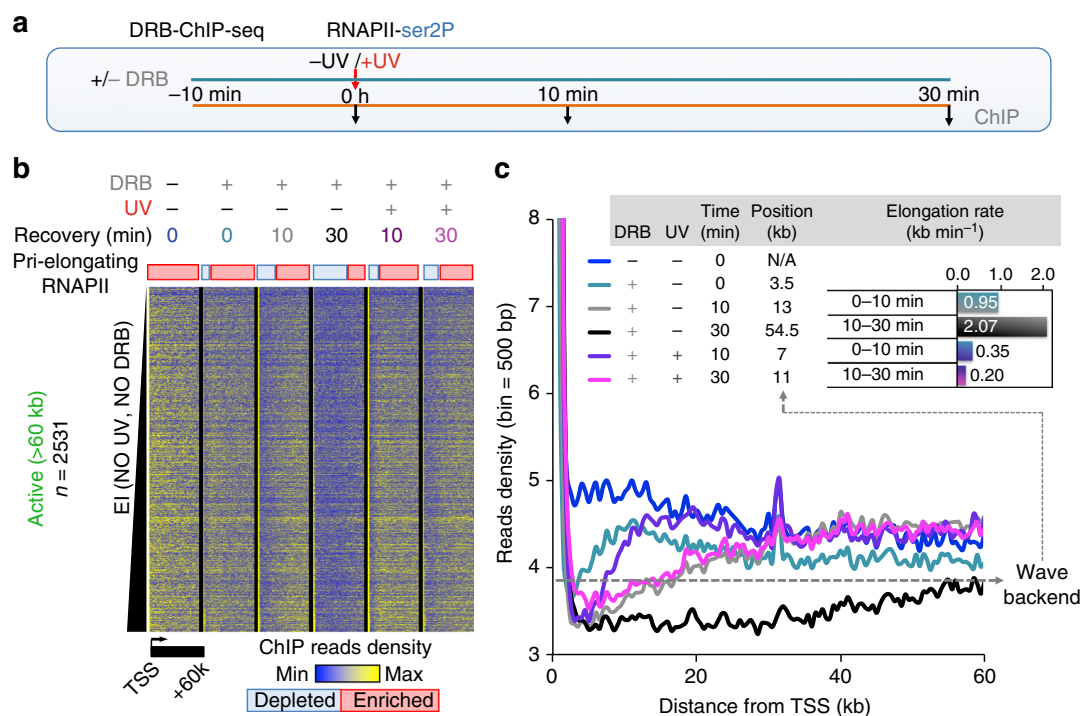
Συμπερασματικά, οι νέες RNA πολυμεράσες που εισρέουν στην επιμήκυνση έπειτα από τη UV, προχωρούν τελικά στο εσωτερικό των γονιδίων με αργό ρυθμό. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 26, μεταξύ 2 και 6 ωρών μετά από την έκθεση, το αρχικό μέτωπο του κύματος της μεταγραφής προχωρά σταδιακά προς το 3' άκρο των γονιδίων.



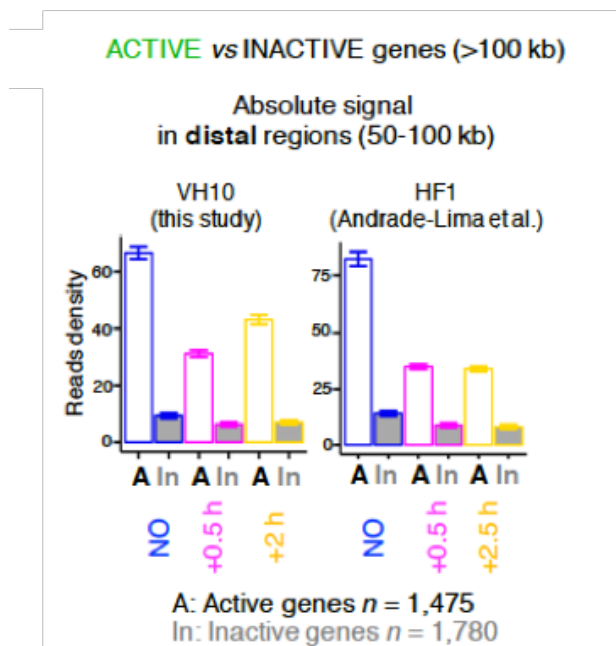
Εικόνα 32 Έπειτα από την έκθεση σε UV, ξεκινούν νέα κύματα μεταγραφής που επιβραδύνονται σταδιακά. **a.** Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας. (βλέπε Μεθόδους). **b.** Σχηματική κατηγοριοποίηση (heatmap) του σήματος των νεοσυντιθέμενων RNA (nRNA) έπειτα από UV ακτινοβολία (20 J/m²). Κάθε γραμμή απεικονίζει ένα ενεργό γονίδιο, από το TSS έως +60kb μετά το TSS, μεγαλύτερο των 60kb. Τα γονίδια ταξινομήθηκαν κατά αυξανόμενο EI (Escape Index). **c.** Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας σήματος του nRNA.

Τέλος, η επώαση με DRB συνετέλεσε στον διαχωρισμό μεταξύ των πολυμερασών που πραγματοποιούν επιμήκυνση ήδη πριν την έκθεση στη UV ακτινοβολία (προ-επιμηκούμενες), από αυτές που ξεκινούν την επιμήκυνση αποκρινόμενες στη UV, έπειτα από την αναδιοργάνωση της μεταγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς ο DRB αναστολέας δεν επιτρέπει σε νέες πολυμεράσες να απελευθερωθούν από τα PPP και να ξεκινήσουν νέο κύκλο επιμήκυνσης.

Πραγματοποιώντας ChIP-seq για την RNAPII-ser2P παρουσία του αναστολέα DRB αντλήσαμε πληροφορίες για τις ήδη προσδεμένες πολυμεράσες στη χρωματίνη. Εστιάζοντας στις προ-UV RNAPII-ser2P, βρήκαμε ότι παραμένουν συνδεδεμένες στη χρωματίνη (Εικόνα 33c- σύγκριση μαύρου με ροζ) σε αντίθεση με προηγούμενη δημοσίευση (Andrade-Lima et al., 2015). Μάλιστα συνεχίζουν την επιμήκυνση της μεταγραφής στα μακρινά σημεία των γονιδίων, αν και με πιο αργούς ρυθμούς. Αυτό υποστηρίζεται και με την ανίχνευση σημαντικού σήματος nRNA στα σημεία αυτά στα ενεργά γονίδια έως και 2 ώρες μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας (Εικόνα 34).



Εικόνα 33 Η αναστολή της μετάπτωσης της RNAPII από τις PPP περιοχές στην επιμήκυνση της μεταγραφής αποσπνίζει την επίδραση της UV ακτινοβολίας στις ήδη επιμηκούμενες RNAPII (pri-elongating). **a.** Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής μεθοδολογίας που προηγήθηκε του ChIP για την RNAPII-ser2P. **b.** Heatmaps που απεικονίζουν την πυκνότητα της RNAPII-ser2P στα ενεργά γονίδια μεγαλύτερα των 60kb, από το TSS έως +60kb μετά το TSS. **c.** Διαγραμματική απεικόνιση των μέσων πυκνοτήτων που απεικονίζονται στο **b.**



Εικόνα 34 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη απόλυτη πυκνότητα των διαβασμάτων του nRNA μετά από ακτινοβολία ($15J/m^2$) σε απομακρυσμένες περιοχές των γονιδίων (distal regions-50 έως 100kb μετά το TSS) των ενεργών και ανενεργών γονιδίων, μεγαλύτερων από 100kb. Απεικονίζονται δύο διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα για τα VH10 κύτταρα (φυσιολογικά) της παρούσας μελέτης συγκρίνονται με αυτά των (Andrade-Lima et al., 2015) με τη μέθοδο Bru-seq σε φυσιολογικά επίσης κύτταρα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίναμε ότι στα αρχικά στάδια μετά από έκθεση των κυττάρων στο συγκεκριμένο γενετοξικό παράγοντα τα επίπεδα του νεοσυντιθέμενου RNA αυξάνονται σημαντικά στο 5' ενεργών γονιδίων, καθώς νέα μόρια RNA πολυμερασών μεταπίπτουν σε φάση επιμήκυνσης. Στη συνέχεια, ο ρυθμός της σύνθεσης επηρεάζεται άμεσα και επιβραδύνεται σταδιακά, όσο οι RNA πολυμεράσες μετακινούνται προς το 3' άκρο των γονιδίων, πιθανώς εξαιτίας των βλαβών που συναντούν κατά μήκος της διπλής έλικας. Αυτές οι βλάβες φαίνεται να επιβραδύνουν εξίσου τις νέες και τις προ-UV RNA πολυμεράσες επιμήκυνσης (Εικόνα 32, Εικόνα 33).

Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες που υποστηρίζουν ότι η έναρξη αλλά και η επιμήκυνση της μεταγραφής συνεχίζουν να συμβαίνουν μετά από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, παρόλο που η πρόοδος των RNA πολυμερασών στο εσωτερικό των γονιδίων είναι πολύ αργή (Williamson et al., 2017).

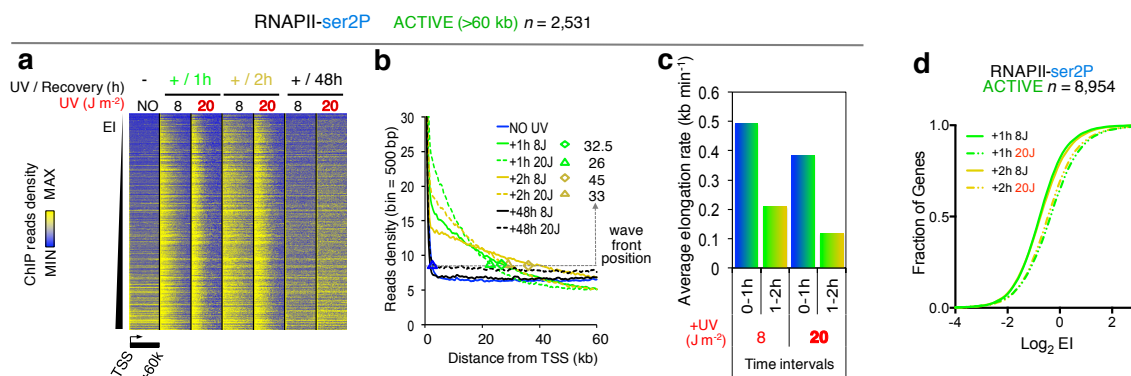
Η απελευθέρωση νέων κυμάτων μεταγραφής ενισχύει την αναγνώριση των βλαβών της διπλής έλικας.

Η συνολική καθυστέρηση στην προσχώρηση της RNAPII στο εσωτερικό των γονιδίων εξαρτάται από τη δόση της UV ακτινοβολίας.

Όσες περισσότερες RNA πολυμεράσες απελευθερώνονται από τις θέσεις παύσης PPP και κινούνται στο εσωτερικό των γονιδίων, τόσο πιο πιθανό είναι να συναντήσουν μία

βλάβη. Κατά συνέπεια τόσο πιο συχνά και πιο γρήγορα θα ενεργοποιείται ο μηχανισμός TC-NER και θα επιδιορθώνονται οι βλάβες που προκλήθηκαν από την UV ακτινοβολία. Για να επιβεβαιώσουμε την παραπάνω υπόθεση και να ελέγξουμε αν η μείωση της ταχύτητας επιμήκυνσης μετά το UV οφείλεται σε αναστολή της πορείας της RNA πολυμεράσης από βλάβες στο μεταγραφόμενο DNA πραγματοποιήσαμε μέτρηση της ταχύτητας των μεταγραφικών κυμάτων μετά από δύο διαφορετικές δόσεις UV ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκε το προφίλ πρόσδεσης της RNAPII-ser2P στη χρωματίνη 1, 2 και 48 ώρες μετά την έκθεση σε 8 J/m² και 20 J/m².

Και οι δύο δόσεις υπεριώδους ακτινοβολίας (20 J/m² και 8 J/m²) προκάλεσαν παρόμοια απελευθέρωση RNA πολυμερασών στο εσωτερικό των γονιδίων, σε όλα τα ενεργά γονίδια. Όμως η υψηλότερη δόση που οδήγησε σε μεγαλύτερο αριθμό βλαβών στο DNA, προκάλεσε την παύση σημαντικά περισσότερων μορίων RNAPII συγκριτικά με τη χαμηλότερη δόση. Αυτό είναι εμφανές από τη μειωμένη μετακίνηση του αρχικού μετώπου των RNA πολυμερασών προς το 3' άκρο των γονιδίων στην υψηλή δόση (Εικόνα 35).



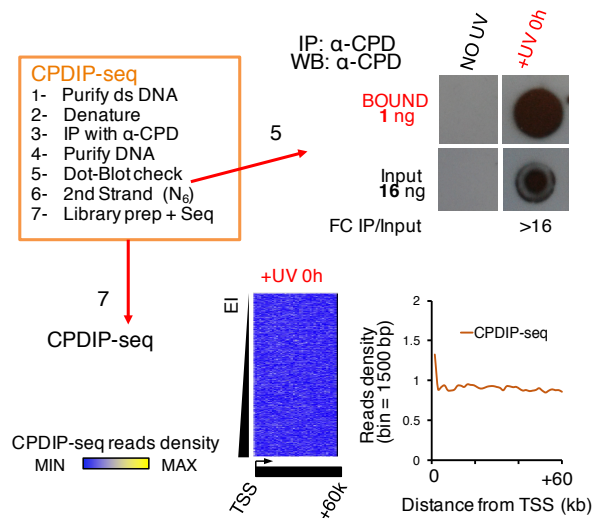
Εικόνα 35 Η συνολική καθυστέρηση στην προσχώρηση της RNAPII στο εσωτερικό των γονιδίων εξαρτάται από τη δόση της UV ακτινοβολίας. **a.** Heatmaps που απεικονίζουν την πυκνότητα της RNAPII-ser2P από το TSS έως 60kb μετά το TSS, σε ενεργά γονίδια μεγαλύτερα των 60kb. Τα γονίδια είναι ταξινομημένα κατά αυξανόμενο EI. Ανευ UV (NO UV) και για διαφορετικές δόσεις UV ακτινοβολίας (8 J/m² και 20 J/m²), έπειτα από 1 ώρα (ανοιχτό πράσινο), 2 ώρες (χρυσάφι) και 48 ώρες (μαύρο) αποκατάστασης. **b.** Γράφημα αποτύπωσης μέσης πυκνότητας του σήματος της RNAPII-ser2P που απεικονίζεται στο **a.** **c.** Ο μέσος ρυθμός επιμήκυνσης (kb/min) προσδιορίστηκε για δύο χρονικά πλαίσια για τις συνθήκες που απεικονίζονται στο **a.** **d.** Γράφημα αποτύπωσης των EI της RNAPII-ser2P σε ενεργά γονίδια και για αυξανόμενες δόσεις UV ακτινοβολίας, έπειτα από 1 και 2 ώρες αποκατάστασης.

Προσδιορισμός θέσεων με βλάβες (DNA lesions)

Στη συνέχεια μελετήσαμε τη δυναμική ανίχνευσης των βλαβών DNA από την RNA πολυμεράση με μέτρηση της συσσώρευσης των RNA πολυμερασών στις περιοχές με βλάβη της διπλής έλικας, μετά από την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι θέσεις των CPDs που δημιουργούνται αμέσως μετά από την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CPDIP-seq (βλέπε μεθόδους). Συνοπτικά, με τη χρήση ειδικού αντισώματος για τα CPDs

απομονώθηκαν οι περιοχές του DNA που περιέχουν βλάβες. Από τα τμήματα αυτά του DNA κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες, οι οποίες στη συνέχεια αλληλουχίστηκαν. Από αυτό το πείραμα φάνηκε ότι η κατανομή των CPDs είναι ομοιόμορφη, σε όλο το μήκος των γονιδίων.

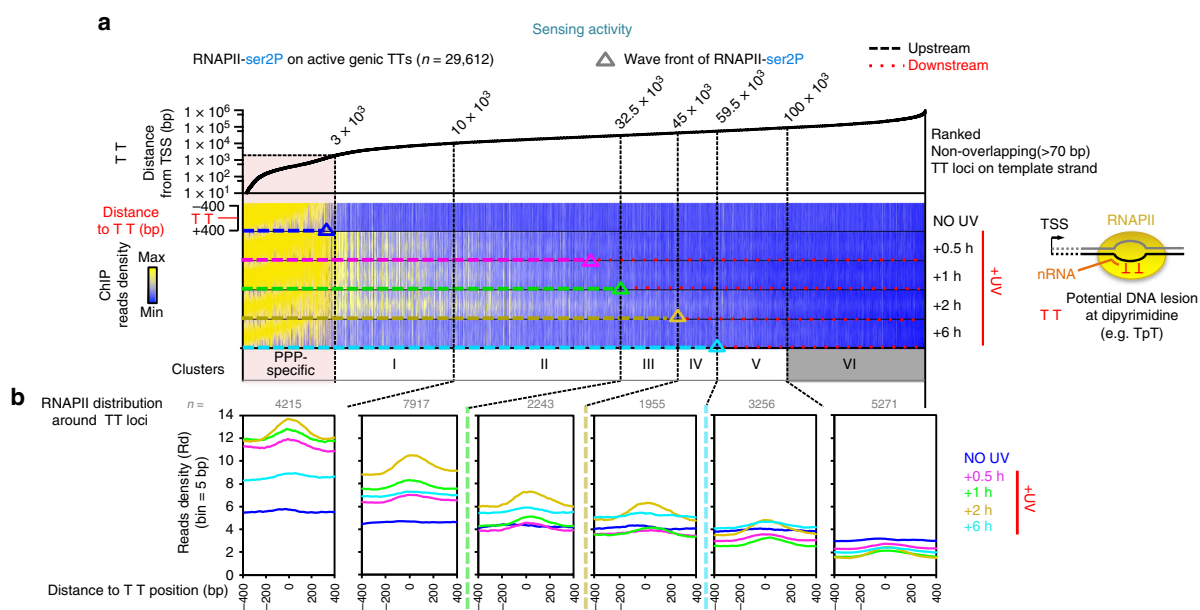


Εικόνα 36 Η τεχνική CPDIP-seq αναπτύχθηκε προκειμένου να μελετηθεί η κατανομή των CPDs που προκαλεί η UV ακτινοβολία. Στο κουτί παρουσιάζονται με συντομία τα βήματα της μεθοδολογίας. Στο βήμα 5 απεικονίζεται η ανάλυση dot-blot που επιβεβαιώνει την αύξηση της αναλογίας των CPDs που περιέχονται σε 1ng DNA, έπειτα από έκθεση σε UV. Στο βήμα 7 απεικονίζεται η ομοιόμορφη κατανομή αυτού του σήματος που προέκυψε μετά από αλληλούχιση των δειγμάτων, από το TSS έως 60kb μετά το TSS. Το DNA απομονώθηκε ακριβώς μετά την ακτινοβολήση.

Στη συνέχεια, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης των RNAPII-ser2P ChIP-seq αποτελεσμάτων (Εικόνα 25), συσχετίστηκαν οι θέσεις των RNAPII-ser2 με τις περιοχές που περιέχουν διμερή θυμίνης (TT). Η ανάλυση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι τα διμερή θυμίνης (TT) είναι οι πιο συχνές θέσεις για τη δημιουργία έπειτα από UV (Mao et al., 2016) και στο ότι το προφίλ επαγωγής CPDs (cyclobutane pyrimidine dimers) υπαγορεύεται από τη συχνότητα των διμερών θυμίνης. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν όλα τα διμερή θυμίνης της μεταγραφόμενης αλυσίδας, τα οποία βρίσκονται στα όρια των ενεργών γονιδίων και σε απόσταση μεγαλύτερη των 70 ζευγαριών βάσεων από τα προηγούμενα ή τα επόμενα TT. Οι TT περιοχές ταξινομήθηκαν με κριτήριο την απόστασή τους από το TSS και στη συνέχεια κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη σχετική τους απόσταση από το αρχικό μέτωπο του κύματος των RNA πολυμερασών II κατά τη χρονική περίοδο αποκατάστασης.

Βρέθηκε ότι στις 2 ώρες μετά την ακτινοβολήση, η συνύπαρξη των RNA πολυμερασών με τις πιθανές περιοχές βλάβης είναι μέγιστη στις περιοχές πριν από το μέτωπο της μεταγραφής (Εικόνα 37). Αυτή η εικόνα δεν μπορεί να οφείλεται σε άνιση κατανομή των βλαβών. Οι βλάβες κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλο το μήκος των γονιδίων όπως υποδείχθηκε από τα CPDs πειράματα (Εικόνα 36) αλλά και από μία πρόσφατη μελέτη (Hu et al., 2017).

Επομένως, η απελευθέρωση μεταγραφικών κυμάτων ως απόκριση στη UV ακτινοβολία συντελεί στον σχηματισμό του γενικού προφίλ κατανομής των RNA πολυμερασών στις θέσεις βλάβης.



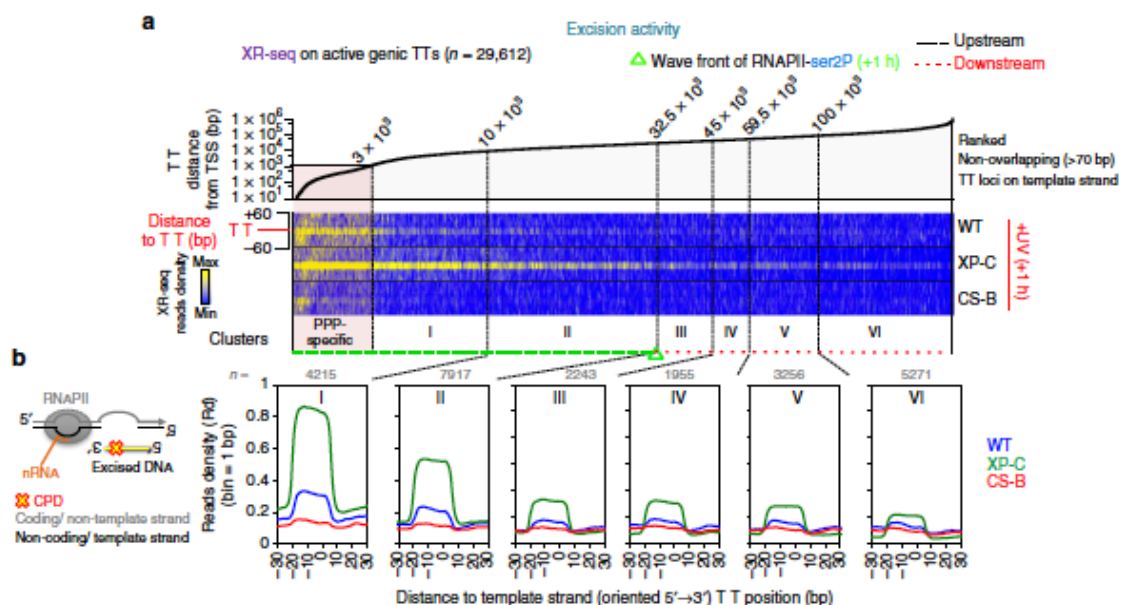
Εικόνα 37 Η απελευθέρωση νέων κυμάτων μεταγραφής ενισχύει την αναγνώριση βλαβών στο DNA από την RNAPII. **a.** Heatmaps που απεικονίζουν την κατανομή του σήματος της RNAPII-ser2P γύρω από τις περιοχές με διμερή θυμίνης (TT), σε ενεργά γονίδια, πριν (NO UV) και μετά από UV ακτινοβολία (+UV, 8J/m²). Ταξινομήση από αριστερά προς τα δεξιά με αυξανόμενη την απόσταση από το TSS. Οι περιοχές με TT ταξινομήθηκαν σε ομάδες πριν (upstream) (clusters I, II, III για +2ώρες) ή έπειτα (downstream, clusters IV, V, VI για +2ώρες) από το μέτωπο του κύματος των RNA πολυμερασών. Με αυτόν τον τρόπο διαχωρίζονται οι νέες πολυμεράσες από τις ήδη επιμηκούμενες (pri-elongating). Τα διμερή θυμίνης που βρέθηκαν κοντά στις PPP περιοχές δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. **b.** Γραφήματα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος της RNAPII-ser2P στις ομάδες που απεικονίζονται στο **a**.

Το νέο κύμα της μεταγραφής εξυπηρετεί στην επιδιόρθωση του DNA

Για να διαπιστώσουμε αν η αυξημένη συσσώρευση πολυμερασών σε θέσεις διμερών θυμίνης 2 ώρες μετά τη UV υποδηλώνει και αυξημένη επιδιόρθωση βλαβών μέσω πυροδότησης του TC-NER μηχανισμού πραγματοποιήσαμε μετα-ανάλυση δεδομένων επιδιόρθωσης DNA με εκτομή νουκλεοτιδίου από το εργαστήριο του Sancar (Hu et al., 2015). Τα δεδομένα αυτά αφορούν ινοβλάστες δέρματος από φυσιολογικά άτομα ή από ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν για NER παράγοντες και επηρεάζουν διαφορετικά τα υπο-μονοπάτια επιδιόρθωσης. Συγκεκριμένα, χαρτογραφήσαμε το DNA που προέκυψε από τη μέθοδο XR-seq (EXcision-Repair) και βασίζεται στην απομόνωση των DNA τμημάτων που φέρουν βλάβες μετά την εκτομή τους από τη χρωματίνη. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε μία ώρα μετά την επαγωγή βλάβης. Στο υλικό αυτό οι θέσεις διμερών θυμίνης προσδιορίστηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και παραπάνω με το RNAPII ChIP-seq (Εικόνα 38).

Τα φυσιολογικά κύτταρα (WT) και τα κύτταρα ασθενών με Xeroderma Pigmentosum (XP-C) μπορούν να επιδιορθώσουν μέσω του TC-NER μονοπατιού τις UV βλάβες που αναστέλλουν τη πορεία των πολυμερασών επιμήκυνσης. Στα κύτταρα αυτά βρέθηκε ότι η επιδιορθωτική δραστηριότητα ήταν αυξημένη στις περιοχές με TTs, οι οποίες βρίσκονταν κοντά στο TSS και πριν από το μέτωπο του κύματος της μεταγραφής. Αντίθετα, στις περιοχές των γονιδίων μετά το μέτωπο του μεταγραφικού κύματος, η επιδιόρθωση ήταν χαμηλότερη λόγω του μικρότερου αριθμού πολυμεράσεων (προ-UV πολυμεράσεις) που θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν βλάβες και να πυροδοτήσουν την επιδιόρθωση τους (Εικόνα 38). Στα κύτταρα με ελαττωματικό TC-NER μονοπάτι (CS-B), τα επίπεδα επιδιόρθωσης στις αντίστοιχες θέσεις δεν ήταν ανιχνεύσιμα, επιβεβαιώνοντας το ουσιώδη ρόλο του μεταγραφικού κύματος στην αυξημένη επιδιόρθωση των UV βλαβών μέσω TC-NER (Εικόνα 38).

Συνολικά η επιδιόρθωση και η παρατεταμένη παραμονή της RNA πολυμεράσης II στα σημεία των βλαβών εξηγούν και την παρατηρούμενη επιβράδυνση των μορίων που απελευθερώνονται εκ νέου (*de novo*).



Εικόνα 38 Η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA μέσω του NER ενισχύεται από την εκ νέου απελευθέρωση μορίων RNAPII μετά από γενετοξικό στρες. **a.** Heatmaps που απεικονίζουν την κατανομή των αποκομμένων τμημάτων DNA κατά την επιδιόρθωση, μία ώρα μετά τη βλάβη. Κυτταρικές σειρές με φυσιολογικό (WT, XP-C) ή ελαττωματικό (CS-B) TC-NER μονοπάτι (διαβάσματα που προέκυψαν από τους Hu et al., 2017). Η ταξινόμηση έχει γίνει από αριστερά προς τα δεξιά με κριτήριο την αυξανόμενη απόσταση από το TSS. Οι περιοχές με TTs ομαδοποιήθηκαν (clusters) σύμφωνα με την θέση της RNAPII (μέτωπο της μεταγραφής), στη +1 ώρα αποκατάστασης από τη βλάβη. Τα διμερή θυμίνης που βρέθηκαν κοντά στις PPP περιοχές δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. **b.** Γραφήματα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος XR-seq στις ομάδες που απεικονίζονται στο **a.**

Η σάρωση του γονιδιώματος μέσω του μεταγραφικού κύματος συντελεί στη διασφάλιση της ακεραιότητάς του και την αποτροπή μεταλλάξεων.

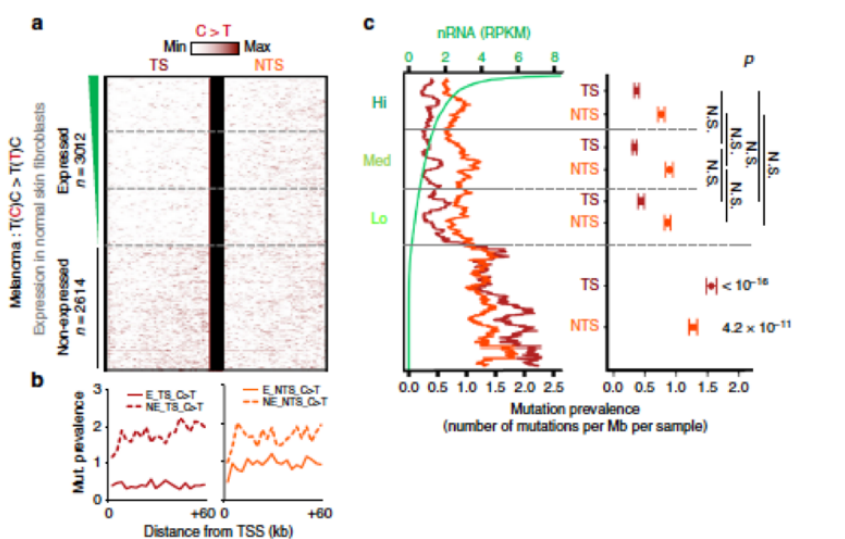
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, προβλέψαμε ότι ο αριθμός των μεταλλάξεων που εξαρτώνται άμεσα από το TC-NER, θα έπρεπε να είναι χαμηλός σε όλα τα ενεργά γονίδια, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκφρασής τους.

Για να εξετάσουμε αυτή την υπόθεση χρησιμοποιήσαμε δημοσιευμένους χάρτες μεταλλαγών από ιστούς που είχαν εκτεθεί σε γενετοξικούς παράγοντες και τελικά ανέπτυξαν καρκίνο. Συγκεκριμένα, εστίασαμε σε δύο σύνολα δεδομένων που στο παρελθόν έχουν σχετιστεί με το NER μονοπάτι (Alexandron et al., 2013; Haradhvala et al., 2016). Αυτά προέρχονταν από μελάνωμα δέρματος και αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. Το μελάνωμα σχετίζεται με αυξημένες αντικαταστάσεις κυτοσίνης από θυμίνη (C>T) μετά από έκθεση στη UV ακτινοβολία, ενώ το αδενοκαρκίνωμα με αυξημένες αντικαταστάσεις γουανίνης από θυμίνη (G>T) μετά από έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Οι μεταλλαγές αυτές παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα στα γονίδια που δεν εκφράζονται.

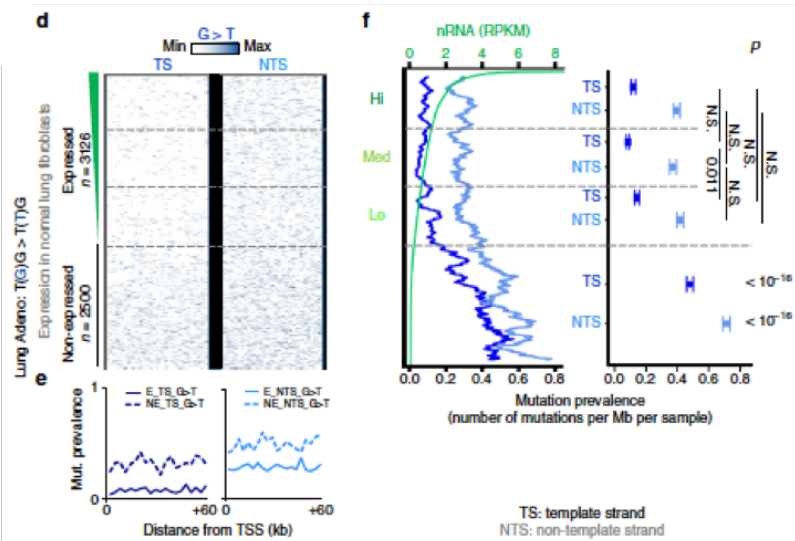
Επιλέξαμε τις C>T (ή τις αντίστοιχες της συμπληρωματικής αλυσίδας G>A) αντικαταστάσεις οι οποίες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλαγών που σχετίζονται με την επίδραση της UV ακτινοβολίας (Alexandron et al., 2013; Haradhvala et al., 2016; Pleasance et al., 2010). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι παρόλο που ο σχηματισμός των CPDs είναι πιο σπάνιο να εμφανιστεί στα διμερή CC, CT και TC συγκριτικά με τα TT, στις περιπτώσεις αυτές η σύνθεση του DNA δεν αναστέλλεται στις περιοχές των βλαβών με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται ακόμα περισσότερα λάθη στο DNA. Αυτό το φαινόμενο οδηγεί σε μεταλλαγές C>T, χαρακτηριστικές της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας στο γονιδίωμα (Εικόνα 39).

Μετα-ανάλυση των παραπάνω δεδομένων οδήγησαν στον εντοπισμό των ακριβών θέσεων των αντικαταστάσεων, συνυπολογίζοντας ταυτόχρονα το ποσοστό έκφρασης του κάθε γονιδίου, την αλυσίδα του γονιδίου (κωδική/μη κωδική), και το είδος του όγκου. Και στα δύο είδη όγκων τα ποσοστά των μεταλλαγών που υπολογίστηκαν ήταν χαμηλά και ομοιόμορφα (Εικόνα 39b, Εικόνα 40e) στις απομακρυσμένες περιοχές των γονιδίων ανεξάρτητα από το επίπεδο της έκφρασής τους (Εικόνα 39c, Εικόνα 40f). Επιπλέον, βρέθηκε ότι στα γονίδια που εκφράζονται η διαφορά στο ποσοστό των μεταλλαγών μεταξύ των δύο αλυσίδων του DNA ήταν περισσότερο φανερή, σε σχέση με τα γονίδια που δεν εκφράζονται. Επίσης, στα εκφραζόμενα γονίδια τα ποσοστά των μεταλλαγών και στις δύο αλυσίδες βρέθηκαν χαμηλότερα συγκριτικά με τα γονίδια που δεν εκφράζονται.

Η εκτενής και ομοιόμορφη απελευθέρωση της RNAPII διευκολύνει τόσο την αποδιάταξη της διπλής έλικας όσο και τη σάρωση του DNA και μεγιστοποιεί την απομάκρυνση των NER σχετιζόμενων βλαβών σε όλα τα εκφραζόμενα γονίδια. Συμπερασματικά, αυτός ο μηχανισμός επηρεάζει σημαντικά το εύρος των μεταλλαγών σε διαφορετικούς ιστούς, ανεξάρτητα από την ακριβή αρχική αιτία που προκάλεσε τη βλάβη.



Εικόνα 39 Το ποσοστό των μεταλλάξεων που παρατηρείται σε όλα τα εκφραζόμενα γονίδια σε UV- σχετιζόμενο μελάνωμα δέρματος είναι χαμηλός και ομοιόμορφος. **a.** Σηματική απεικόνιση (heatmap) που απεικονίζει την κατανομή και τις θέσεις των περισσότερων συχνών αντικαταστάσεων που σχετίζονται με τη UV ακτινοβολία. C>T μεταλλαγές σε μελάνωμα δέρματος. Απεικονίζονται οι θέσεις των μεταλλαγών στην κωδική (TS) και στη μη κωδική (NTS) αλυσίδα. Τα γονίδια έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από τα επίπεδα του nRNA σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος. E (expressed): Τα γονίδια που εκφράζονται και NE (non expressed): τα γονίδια που δεν εκφράζονται. **b.** Το μέσο προφίλ των μεταλλαγών στα γονίδια που εκφράζονται, και σε αυτά που δεν εκφράζονται. **c.** Ποσοτική συσχέτιση της ύπαρξης μεταλλάξεων στην κωδική (σκούρο κόκκινο) και στη μη κωδική (ανοιχτό κόκκινο) σε σχέση με τα επίπεδα nRNA (πράσινο).



Εικόνα 40 Το ποσοστό των μεταλλάξεων που παρατηρείται σε όλα τα εκφραζόμενα γονίδια σε αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα σχετιζόμενο με το κάπνισμα, είναι χαμηλός και ομοιόμορφος **d**. Σχηματική απεικόνιση (heatmap) που απεικονίζει την κατανομή και τις θέσεις των περισσότερο συχνών αντικαταστάσεων που σχετίζονται με τη UV ακτινοβολία. C>T μεταλλάξεις σε μελάνωμα δέρματος. Απεικονίζονται οι θέσεις των μεταλλαγών στην κωδική (TS) και στη μη κωδική (NTS) αλυσίδα. Τα γονίδια έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από τα επίπεδα του nRNA σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος. E (expressed): Τα γονίδια που εκφράζονται και NE (non expressed): τα γονίδια που δεν εκφράζονται. **e**. Το μέσο προφίλ των μεταλλαγών στα γονίδια που εκφράζονται, και σε αυτά που δεν εκφράζονται. **f**. Ποσοτική συσχέτιση της ύπαρξης μεταλλάξεων στην κωδική (σκούρο κόκκινο) και στη μη κωδική (ανοιχτό κόκκινο) σε σχέση με τα επίπεδα nRNA (πράσινο).

CS-B κύτταρα

Παραπάνω περιεγράφηκε η αναδιοργάνωση της μεταγραφής στα φυσιολογικά κύτταρα ως απόκριση στις βλάβες που προκαλεί η UV ακτινοβολία. Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της CSB πρωτεΐνης, πραγματοποιήσαμε την ίδια μελέτη στα μεταλλαγμένα κύτταρα.

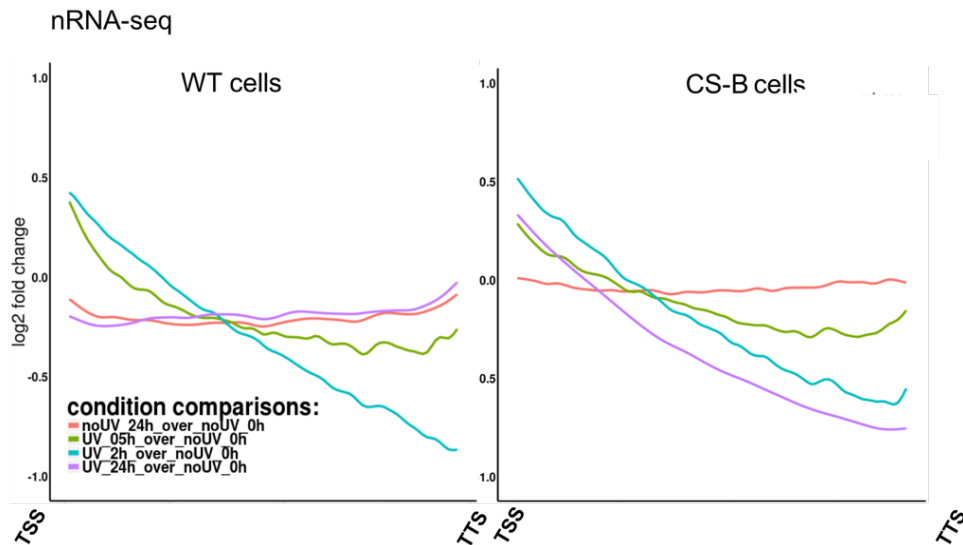
Μελέτη της απόκρισης των CS-B κυττάρων στην υπεριώδη ακτινοβολία

Αρχικά απομονώθηκε το nascent RNA (nRNA) πριν και μετά την επίδραση UV ακτινοβολίας. Με αυτό το πείραμα επιβεβαιώθηκε η πτώση της μεταγραφής 2 ώρες μετά την έκθεση καθώς και το γεγονός ότι η μεταγραφή δεν ανακάμπτει 24 ώρες μετά σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα.

Ωστόσο παρατηρήθηκε κάτι μη αναμενόμενο σε σχέση με τις έως τώρα μελέτες στα CS-B κύτταρα. Παρόλο που το nRNA σήμα μειώνεται συνολικά, παρατηρείται σύνθεση νέου RNA η οποία περιορίζεται στην αρχή των γονιδίων (5' άκρο) (Εικόνα 41: CS-B κύτταρα: μισή ώρα και δύο ώρες. Παρόμοια εικόνα με τα VH10). Συγκρίνοντας το σήμα του nRNA στις δύο κυτταρικές σειρές 2 ώρες μετά την έκθεση, συμπεραίνουμε ότι και στα CS-B, όπως και στα φυσιολογικά κύτταρα ξεκινά ένα νέο κύμα νεοσυντιθέμενου RNA. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν είχε αναφερθεί, πιθανώς λόγω των μεθόδων που χρησιμοποιούνταν για την ποσοτικοποίηση της μεταγραφής. Στην περίπτωση μας, η μέθοδος ανάλυσης του νεοσυντιθέμενου RNA (nascent RNA) μας έδωσε τη δυνατότητα να εντοπίσουμε μικρά τμήματα μορίων RNA τα οποία έως τώρα δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτούν.

Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά το γεγονός ότι στα CS-B κύτταρα η μεταγραφή δεν επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα στις 24 ώρες ανάκαμψης, νέα μόρια nRNA συνεχίζουν να παράγονται στα ενεργά γονίδια αλλά η μεταγραφή τους δεν ολοκληρώνεται. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εξακολουθούν να χαρακτηρίζονται από το προφίλ των 2 ωρών (Εικόνα 41:μοβ καμπύλες), προφανώς λόγω της παρατεταμένης παρεμπόδισης της πορείας των πολυμερασών επιμήκυνσης από τις βλάβες.

Συμπερασματικά, η έλλειψη λειτουργικής CSB πρωτεΐνης δεν αναστέλλει τη σύνθεση νέων μορίων RNA έπειτα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η σύνθεση όμως αυτών των νεοσυντιθέμενων μορίων RNA δεν είναι δυνατόν να ολοκληρωθεί ακόμα και πολλές ώρες αργότερα, πιθανώς λόγω συσσώρευσης βλαβών κατά μήκος των γονιδίων.



Εικόνα 41 Στα CS-B κύτταρα παρατηρούνται νέα μόρια νεοσυντιθέμενου RNA, τα οποία περιορίζονται στην αρχή των γονιδίων αμέσως μετά αλλά και πολλές ώρες αργότερα από την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας. Γραφήματα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας σήματος nRNA στα ενεργά γονίδια σε κάθε κυτταρική σειρά, διαφύμενο με το σήμα πριν την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Στα φυσιολογικά κύτταρα (WT) παρατηρείται διατήρηση του σήματος στο 3' άκρο και μείωση στο 5' άκρο, στα 30 λεπτά (πράσινο) και στις 2 ώρες (μπλε) μετά τη βλάβη. Το σήμα επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα 24 ώρες μετά (μοβ). Στα κύτταρα με μη λειτουργική CSB πρωτεΐνη (CS-B), το σήμα διατηρείται στο 5' άκρο και μειώνεται στο 3' άκρο των γονιδίων 24 ώρες μετά τη βλάβη. (NOUV24h/NOUV0h: κόκκινο, UV0,5h/NOUV0h: πράσινο, UV2h/NOUV0: τρκουάζ, UV24h/NOUV0h: μοβ)

Η ανίχνευση νέου nRNA ακόμα και 24 ώρες μετά από τη UV έκθεση, υποδεικνύει ότι στα CS-B κύτταρα οι εναρκτήριες RNAPII εισέρχονται μεν στην επιμήκυνση, ωστόσο η μεταγραφή δεν είναι δυνατόν να ολοκληρωθεί.

Σημείο ελέγχου PPP

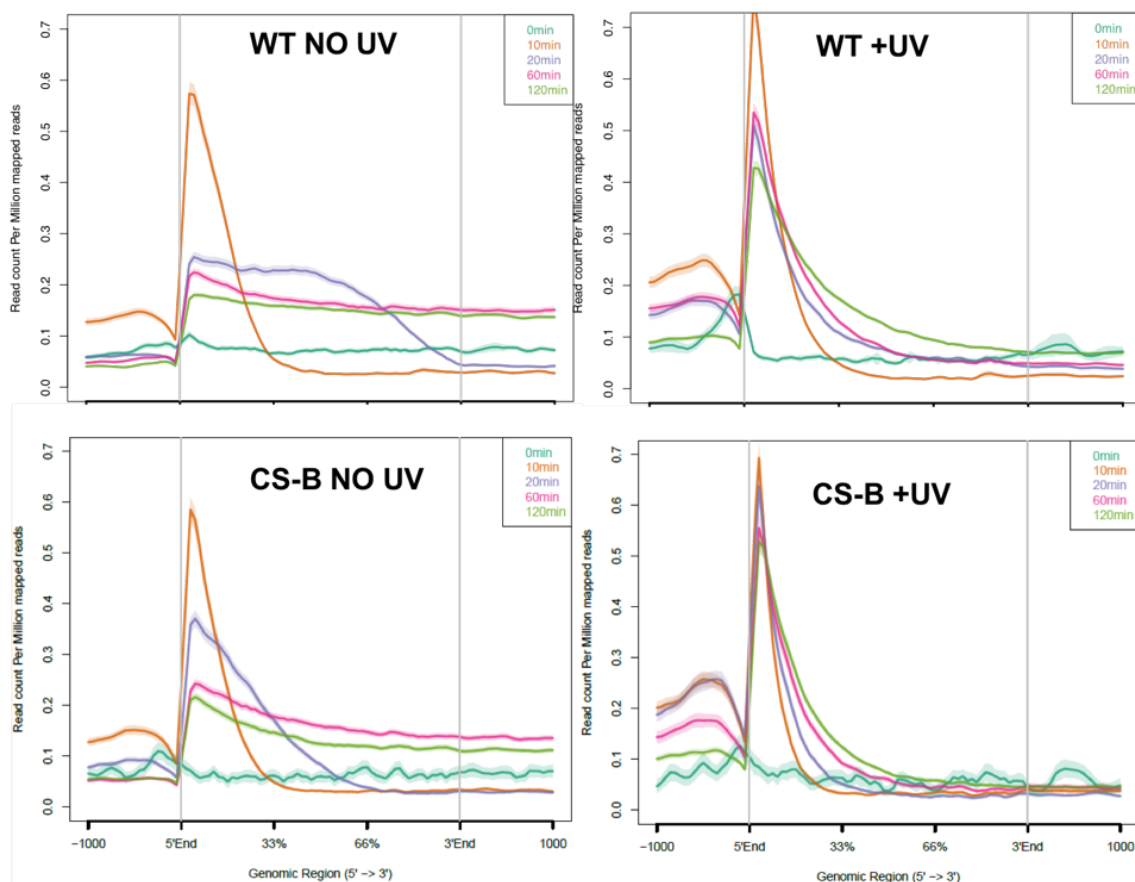
Όπως αναφέρθηκε, η έλλειψη της CSB δεν εμποδίζει την έναρξη και τα αρχικά στάδια επιμήκυνσης της μεταγραφής μετά την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας.

Επόμενος στόχος ήταν να διερευνήσουμε την απελευθέρωση των RNA πολυμερασών από το σημείο ελέγχου PPP (Proximal Promoter Pausing Site), ως άμεση απόκριση στη βλάβη στα CS-B κύτταρα. Για τον λόγο αυτό ακολουθήσαμε την ίδια μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στα φυσιολογικά κύτταρα (DRB-nRNA). Έτσι, αποκλείοντας τις προ-UV πολυμεράσες επιμήκυνσης, μελετήσαμε την πρόοδο μόνο νέων RNA πολυμερασών που μεταπίπτουν στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης.

Η ανάλυση του πειράματος έδειξε ότι νέες RNA πολυμεράσες ξεκινούν να συνθέτουν nRNA στα CS-B κύτταρα. Η διαφορά με τα φυσιολογικά κύτταρα (WT) έγκειται στην ταχύτητα. Παρατηρούμε μία χρονοκαθυστερήση στην απελευθέρωση από το PPP η οποία φαίνεται ήδη στα 10 πρώτα λεπτά μετά την έκθεση σε UV (Εικόνα 42: πορτοκαλί), και συνεχίζεται έως και τα 120 λεπτά (Εικόνα 42: πράσινο). Ομοίως, βρήκαμε ότι η ταχύτητα σύνθεσης nRNA από

την RNA πολυμεράση II παρουσιάζει μια μικρή καθυστέρηση και σε φυσιολογικές συνθήκες στα CS-B κύτταρα (Εικόνα 42: NO UV). Όμως, η καθυστέρηση αυτή μεγιστοποιείται έπειτα από έκθεση σε υπερϊώδη ακτινοβολία.

Επομένως, η έλλειψη της CSB πρωτεΐνης δεν αποτρέπει την απελευθέρωση νέων πολυμερασών επιμήκυνσης από το σημείο ελέγχου PPP, αλλά πιθανώς η παρουσία της διευκολύνει τη διαδικασία αυτή.

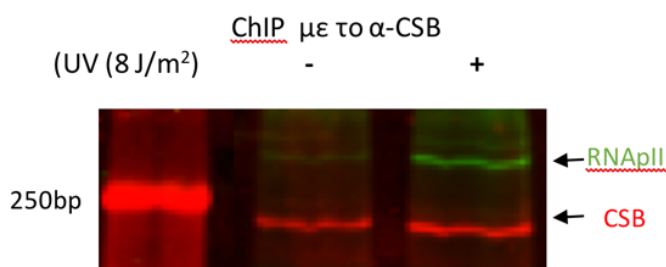


Εικόνα 42 Συγκριτική μελέτη της μεταγραφής χωρίς και αμέσως μετά την επίδραση UV ακτινοβολίας σε φυσιολογικά (WT) και CS-B κύτταρα. Η έλλειψη της CSB δεν αποτρέπει την απελευθέρωση RNA πολυμερασών από το PPP, φαίνεται όμως να την καθυστερεί. Η καθυστέρηση αυτή είναι εμφανής υπό φυσιολογικές συνθήκες και επιτείνεται μετά από την επίδραση της UV ακτινοβολίας. (χρόνος 0: σκούρο πράσινο, 10λεπτά: πορτοκαλί, 20λεπτά: μοβ, 60λεπτά: φούξια, 120λεπτά: ανοιχτό πράσινο)

Προφίλ πρόσδεσης της CSB πρωτεΐνης

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα σημεία πρόσδεσης των CS πρωτεϊνών, πριν και μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση σε γενωμικό επίπεδο μετά από ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP-sequencing) με το αντίσωμα για τη CSB πρωτεΐνη.

Αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα των αντισωμάτων της CSB να ανοσοκατακρημνίζουν τη χρωματίνη με την τεχνική ChIP- Western (Fousteri et al., 2006). Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε μεγαλύτερη κατακρήμνιση της RNAPII από τη CSB πρωτεΐνη μία ώρα μετά από ακτινοβολία, όπως ήταν αναμενόμενο (Εικόνα 43) (van Gool, A.J. et al., 1997).



Εικόνα 43 Western blot ανάλυση του CSB ChIP. Με κόκκινο απεικονίζεται η CSB πρωτεΐνη σε χρωματίνη φυσιολογικών κυττάρων πριν και μετά από ακτινοβολία καθώς και η RNAPII με πράσινο. Η CSB συνεντοπίζεται με την RNAPII πάνω στη χρωματίνη, 1 ώρα μετά την UV-ακτινοβολία.

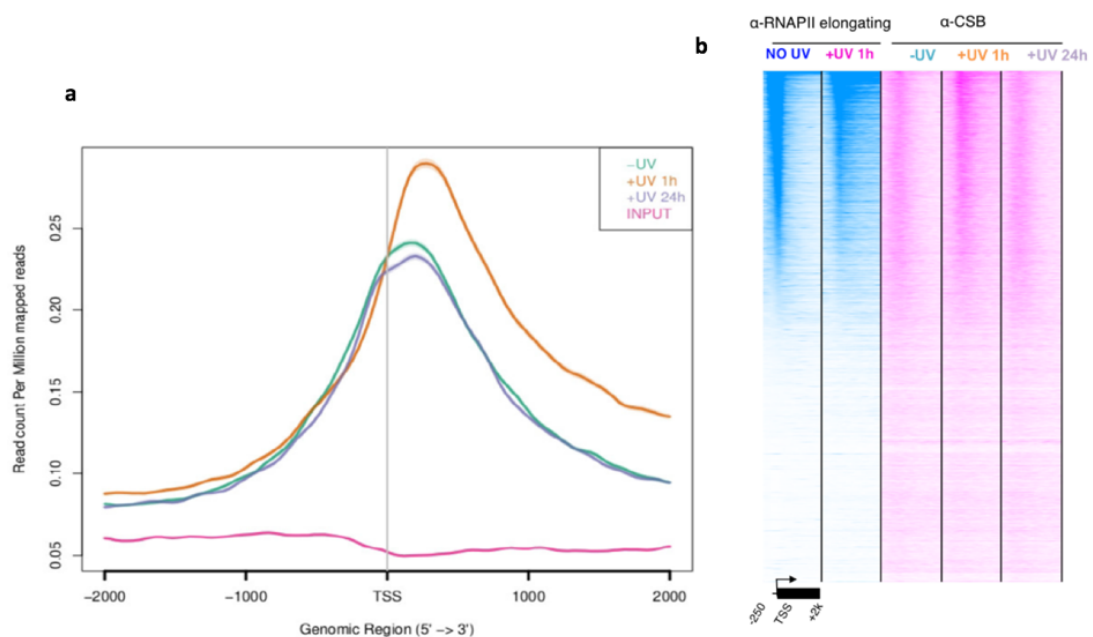
Αφού βεβαιωθήκαμε για την ποιότητα του CSB αντισώματος, πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με το CSB αντίσωμα σε φυσιολογικά κύτταρα πριν και σε διαφορετικούς χρόνους μετά από την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας (NO UV, 1h, 24h), με στόχο να απομονωθεί το DNA και να αλληλουχιθεί. Στις ίδιες συνθήκες επαναλήφθηκε και η ανοσοκατακρήμνιση με το αντίσωμα της RNAPII-ser2P.

Μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των παραπάνω πειραμάτων, μελετήθηκαν τα σημεία πρόσδεσης της CSB πρωτεΐνης και ακολούθησε σύγκριση των προτύπων πρόσδεσης της CSB και της RNAPII στο γονιδίωμα. Παρατηρήθηκε ότι στα φυσιολογικά κύτταρα το πρότυπο πρόσδεσης της CSB ακολουθεί τη δυναμική της RNA πολυμεράσης που πραγματοποιεί επιμήκυνση. Απουσία UV, η CSB πρωτεΐνη προσδέεται σε κοντινές περιοχές στα σημεία έναρξης της μεταγραφής (TSS) σε όλα τα ενεργά γονίδια. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με την υπόθεση συμμετοχής της CSB πρωτεΐνης στη ρύθμιση της μεταγραφής (Εικόνα 44 NO UV). Μετά την έκθεση στη UV ακτινοβολία, η πρόσδεση της CSB αυξάνεται και το μέσο σήμα της μετατοπίζεται εντός των γονιδίων. Και πάλι το πρότυπο πρόσδεσης της CSB συμβαδίζει με αυτό της RNA πολυμεράσης II μετά από βλάβη και συγκεκριμένα με τον νέο μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες που προτάθηκε παραπάνω στα φυσιολογικά κύτταρα και που σχετίζεται άμεσα με την απελευθέρωση συγχρονισμένων μεταγραφικών κυμάτων RNA πολυμερασών επιμήκυνσης από τις θέσης παύσης της μεταγραφής πλησίον των υποκινητών (Εικόνα 44 + UV).

Με τα τελευταία πειράματα προκύπτουν δύο πιθανοί ρόλοι για τη CSB πρωτεΐνη ως απόκριση στην UV ακτινοβολία ακτινοβολία επιπρόσθετα της ήδη γνωστής της δράσης στην

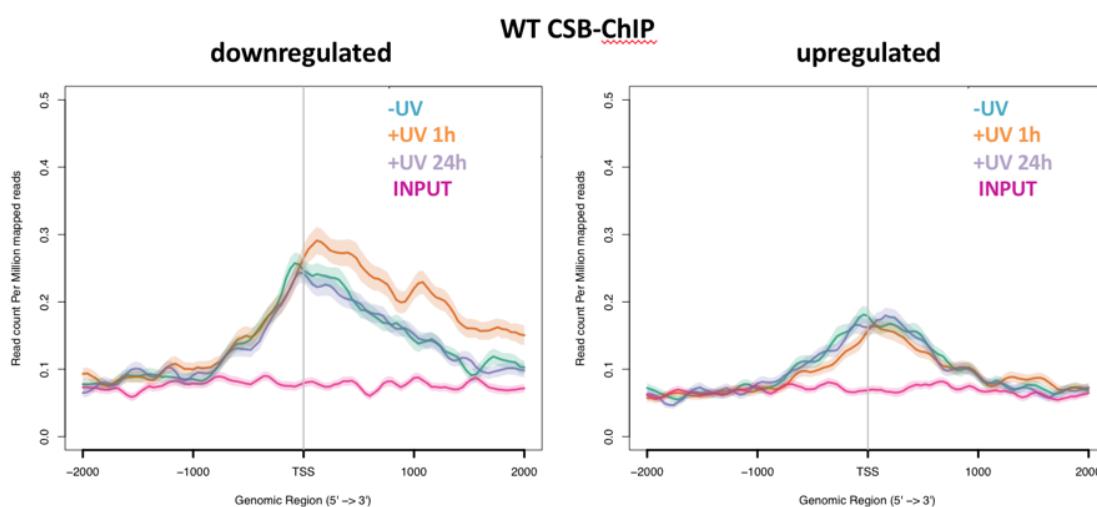
επιδιόρθωση DNA βλαβών μέσω TC-NER (Vermeulen and Fousteri, 2013). Το πρώτο ενδεχόμενο είναι ότι η CSB από τα σημεία έναρξης της μεταγραφής μεταφέρεται στα σημεία ελέγχου PPP. Εκεί με τη δράση της διευκολύνει την απελευθέρωση των μορίων RNAPII στο εσωτερικό των γονιδίων, στα πλαίσια του νέου κύματος μεταγραφής. Το δεύτερο σενάριο είναι ότι η CSB μετακινείται πάνω στα γονίδια μαζί με την RNAPII, ακολουθώντας τα νέα κύματα μεταγραφής που απελευθερώνονται από το σημείο ελέγχου PPP, προκειμένου να διορθωθούν οι βλάβες το συντομότερο δυνατόν.

Η δυναμική μετακίνηση της CSB ως απόκριση στη βλάβη και η αδυναμία αποκατάστασης της μεταγραφής στα CS-B κύτταρα, διαβεβαιώνουν ότι η παρουσία της CSB απαιτείται για την αποκατάσταση της μεταγραφής στα σημεία της βλάβης. Επομένως, η έλλειψη της CSB πρωτεΐνης είτε καθυστερεί την απελευθέρωση της RNAPII από τα PPPs, είτε απλώς την πρόοδο των RNAPII, καθώς οι βλάβες δεν επιδιορθώνονται. Κατά συνέπεια, οι σταματημένες RNA πολυμεράσες II συσσωρεύονται στα σημεία των βλαβών.



Εικόνα 44 α. Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος της πρωτεΐνης CSB στα ενεργά γονίδια σε φυσιολογικά κύτταρα. Απουσία UV, παρατηρείται πρόσδεση της CSB πρωτεΐνης σε περιοχές κοντά στα σημεία έναρξης της μεταγραφής (πράσινο), ενώ 1 ώρα μετά την επίδραση UV ακτινοβολίας, το σήμα ενισχύεται και μετατοπίζεται προς το εσωτερικό των γονιδίων (πορτοκαλί). Πολλές ώρες αργότερα και μετά την αποκατάσταση της μεταγραφής, το σήμα επανέρχεται στην αρχική κατάσταση (μοβ). **β.** Heatmap σύγκρισης της πρόσδεσης της RNAPII-ser2 και της CSB στα ενεργά γονίδια. Το προφίλ πρόσδεσης του CSB ακολουθεί αυτό της RNA πολυμεράσης, πριν και μετά τη βλάβη.

Ακολούθησε επιπλέον ανάλυση της πυκνότητας του σήματος της CSB πρωτεΐνης για τα γονίδια που παρουσιάζουν είτε μειωμένη είτε αυξημένη έκφραση στους CS-B ασθενείς σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα σύμφωνα με την παραπάνω mRNA ανάλυση (Εικόνα 17). Βρέθηκε ότι τα γονίδια που υποεκφράζονται στους CS-B ασθενείς, είναι αυτά στα οποία παρατηρείται η μέγιστη πρόσδεση της CSB πριν και μετά την επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας στα φυσιολογικά κύτταρα. Η μειωμένη έκφραση αυτών των γονιδίων πιθανώς να σχετίζεται με τον φαινότυπο των ασθενών. Συγκεκριμένα, υποθέτουμε ότι αυτά τα γονίδια χρειάζονται τη CSB πρωτεΐνη για τη φυσιολογική τους μεταγραφή αλλά και για την αποκατάστασή της μετά από εναπόθεση βλαβών στο DNA (Εικόνα 45).



Εικόνα 45 Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος της πρωτεΐνης CSB σε φυσιολογικά κύτταρα. Σε γονίδια που υποεκφράζονται (*downregulated*) ή υπερεκφράζονται (*upregulated*) στα CS-B κύτταρα, σύμφωνα με την αρχική ανάλυση mRNA-seq. Το πρότυπο πρόσδεσης της πρωτεΐνης στην πρώτη κατηγορία γονιδίων ταυριάζει με το συνολικό (

Εικόνα 44α).

Από τα παραπάνω πειράματα συνοψίζουμε τα εξής. Ως απόκριση στην υπερϊώδη ακτινοβολία στα φυσιολογικά αλλά και στα CS-B κύτταρα παρατηρείται αναδιοργάνωση της μεταγραφής. Συγκεκριμένα ένα νέο κύμα μεταγραφής ξεκινά, από νέες RNA πολυμεράσες II, οι οποίες απελευθερώνονται στο εσωτερικό των γονιδίων από τα σημεία PPP, πραγματοποιώντας επιμήκυνση. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η πιθανότητα των RNAPII να συναντήσουν τις βλάβες που προκλήθηκαν και να πυροδοτήσουν την επιδιόρθωσή τους. Στα φυσιολογικά κύτταρα αυτός ο μηχανισμός αποδίδει, οι βλάβες επιδιορθώνονται με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα από ότι οι βλάβες που επιδιορθώνονται μέσω του GG-NER μονοπατιού και τα επίπεδα της μεταγραφής επιστρέφουν στα φυσιολογικά. Η πρωτεΐνη CSB φαίνεται να

συμβάλει σημαντικά σε αυτόν τον μηχανισμό, πιθανώς διευκολύνοντας και επιταχύνοντας τη διαδικασία ανίχνευσης και επιδιόρθωσης από το νέο κύμα μεταγραφής.

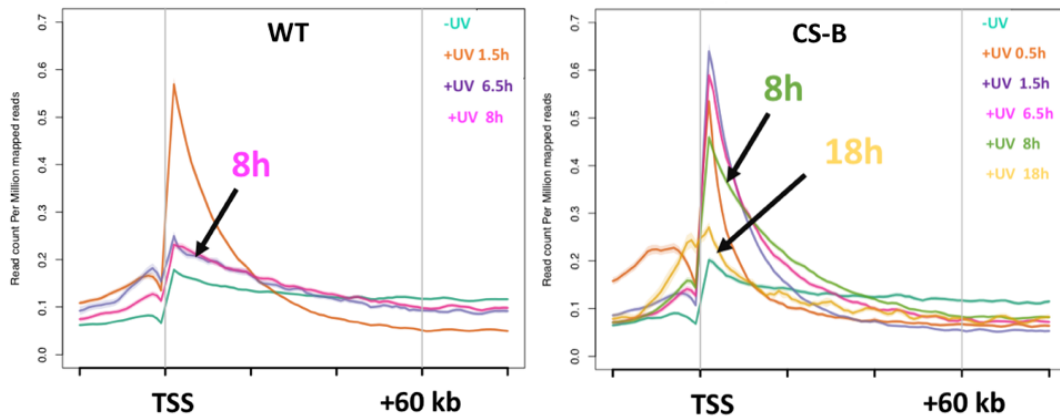
Μολονότι στα κύτταρα με μη λειτουργική CSB πρωτεΐνη η μεταγραφή δεν αποκαθίσταται (Εικόνα 18, Εικόνα 41), νέες RNA πολυμεράσες συνεχίζουν απελευθερώνονται προς το εσωτερικό των γονιδίων ακόμα και πολλές ώρες μετά την επαγωγή των βλαβών (Εικόνα 41, Εικόνα 42).

Η τύχη των μορίων της RNA πολυμεράσης II

Το επόμενο ερώτημα που θέσαμε ήταν αν οι RNA πολυμεράσες που πραγματοποιούν επιμήκυνση παραμένουν στα σημεία όπου συναντούν βλάβη μαζί με το nRNA και συσσωρεύονται εκεί, ή αποικοδομούνται και απομακρύνονται από τη χρωματίνη και ακολουθούν οι επόμενες.

Για να εξακριβώσουμε τι συμβαίνει κάναμε το ακόλουθο πείραμα: σημάναμε το νεοσυντιθέμενο RNA των κυττάρων με EU για μισή ώρα πριν και μισή ώρα μετά την έκθεση των κυττάρων στη UV και έπειτα τα αφήσαμε να ανακάμψουν σε υλικό χωρίς EU. Μετά από 1.5, 6.5 και 8 ώρες αναζητήσαμε το σημασμένο RNA που συντέθηκε στα πρώτα 30 λεπτά μετά την έκθεση σε UV (pulse-chase labelling), το οποίο απομονώθηκε και αλληλουχίθηκε. Βρέθηκε ότι στα φυσιολογικά κύτταρα το σημασμένο RNA εντοπίζεται μέχρι και 1.5 ώρα μετά την έκθεση, ενώ έπειτα από 6.5 και 8 ώρες μειώνεται δραματικά, υποδεικνύοντας την επιδιόρθωση των βλαβών που συμβαίνει σε αυτό το χρονικό πλαίσιο. Οι RNA πολυμεράσες που είχαν σταματήσει στα σημεία των βλαβών ή είχαν συσσωρευτεί πίσω από τις σταματημένες πολυμεράσες, προχωρούν μετά την απομάκρυνση των βλαβών και ολοκληρώνουν τη μεταγραφή. Αντίθετα στα CS-B κύτταρα όπου οι βλάβες δεν είναι δυνατόν να επιδιορθωθούν, τα μόρια RNA που σημάθηκαν στα πρώτα 30 λεπτά εντοπίζονται έως και 8 ώρες μετά, ενώ στις 18 ώρες έπειτα από την έκθεση στη UV ακτινοβολία, το σήμα μειώνεται δραματικά (Εικόνα 46).

Pulse-chase nRNA-seq



Εικόνα 46 Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος του *pulse-chase* nRNA στα φυσιολογικά (WT) και στα CS-B κύτταρα. Στα WT κύτταρα το αρχικά σηματοδοτούμενο με EU RNA εντοπίζεται στη 1.5 ώρα μετά την έκθεση (πορτοκαλί), ενώ στις 6.5 (μοβ) και 8 ώρες (ροζ) μετά μειώνεται δραματικά. Στα CS-B κύτταρα οι βλάβες δεν είναι δυνατόν να επιδιορθωθούν. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA που σημάνθηκαν στα πρώτα 30 λεπτά εντοπίζονται έως και 8 ώρες μετά (πράσινο), ενώ στις 18 (κίτρινο) το σήμα μειώνεται δραματικά.

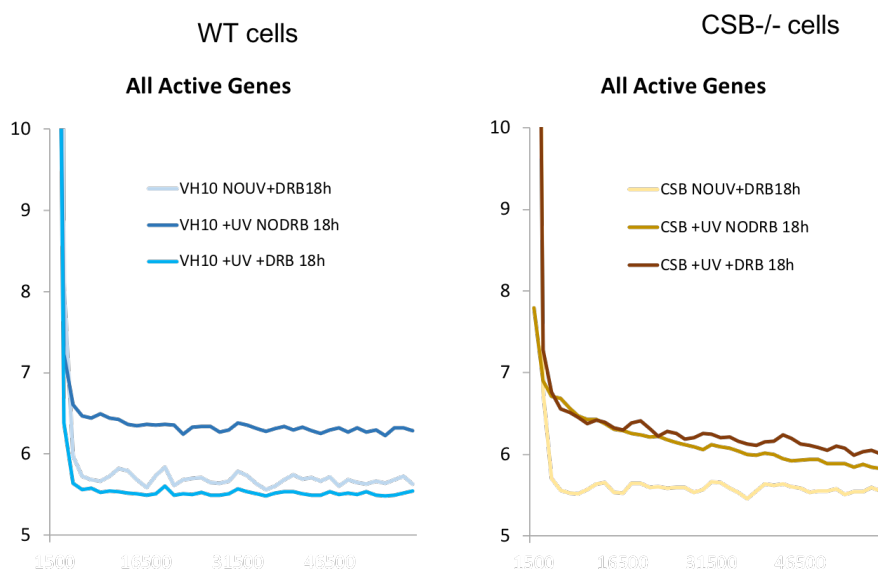
Εφόσον γνωρίζουμε ότι η μεταγραφή δεν αποκαθίσταται στα CS-B κύτταρα, πιθανώς τα μόρια RNA που παραμένουν στο σημείο της βλάβης να αποικοδομούνται στο διάστημα μεταξύ 8 και 18 ωρών μετά την έκθεση σε UV. Ενδεχομένως αυτό να είναι απαραίτητο λόγω της συσσώρευσης όλο και περισσότερων RNA πολυμερασών II μαζί με τα nRNAs τους στα σημεία των βλαβών που αδυνατούν να επιδιορθωθούν. Σε συμφωνία με αυτό, όπως αναφέρθηκε στα πειράματα nRNA-seq (Εικόνα 41) παρατηρήθηκε σύνθεση νέου RNA που περιορίζεται κοντά στο 5' άκρο των γονιδίων ακόμα και 24 ώρες μετά τη UV.

Συνωστισμός RNAPII στα σημεία των βλαβών

Προκειμένου να εξετάσουμε αν η παρατηρούμενη σύνθεση nRNA οφείλεται στη συνεχή απελευθέρωση νέων πολυμερασών σε αυτό το διάστημα, πραγματοποιήσαμε CHIP-seq για την RNAPII-ser2, 18 ώρες μετά την έκθεση σε UV, αφού όμως πρώτα επώασαμε τα κύτταρα με DRB για τις τρεις τελευταίες ώρες (15-18 ώρες). Με αυτόν τον τρόπο αποκλείστηκαν από τη μελέτη οι πολυμεράσες που υποθετικά θα ήταν σε θέση να προχωρήσουν και να ολοκληρώσουν τη μεταγραφή καθώς και επίσης αναστάληκε η είσοδος νέων RNA πολυμερασών για τις τελευταίες 3 ώρες. Επομένως, το παρατηρούμενο σήμα θα είναι αυτό των πολυμερασών που δεν είναι σε θέση να προχωρήσουν τη μεταγραφή, δηλαδή αυτών που είναι σταματημένες στα σημεία των βλαβών.

Με το παραπάνω πείραμα, παρατηρήθηκε σημαντικός αριθμός μορίων RNAPII οι οποίες προχωρούν με πολύ αργό ρυθμό στο εσωτερικό των γονιδίων, χωρίς όμως να επιτυγχάνεται η αποκατάσταση της μεταγραφής. Στα CS-B κύτταρα που επώαστηκαν με DRB (Εικόνα 47, σκούρο καφέ) το σήμα της RNAPII μειώνεται ελαφρώς στην αρχή και μετακινείται προς το εσωτερικό των γονιδίων, σε σύγκριση με τα δείγματα χωρίς DRB (Εικόνα 47, ανοιχτό καφέ) καθώς έχει αποκλειστεί η είσοδος νέων RNA πολυμερασών από τα σημεία PPP. Τα παρατηρούμενα μόρια RNAPII είναι αυτά που έχουν παραμείνει στα σημεία των βλαβών για τουλάχιστον 3 ώρες (χρόνος επώασης με DRB) και όπως δείχθηκε από το pulse-chase nRNA-seq, παραμένουν εκεί για αρκετές ώρες ακόμα.

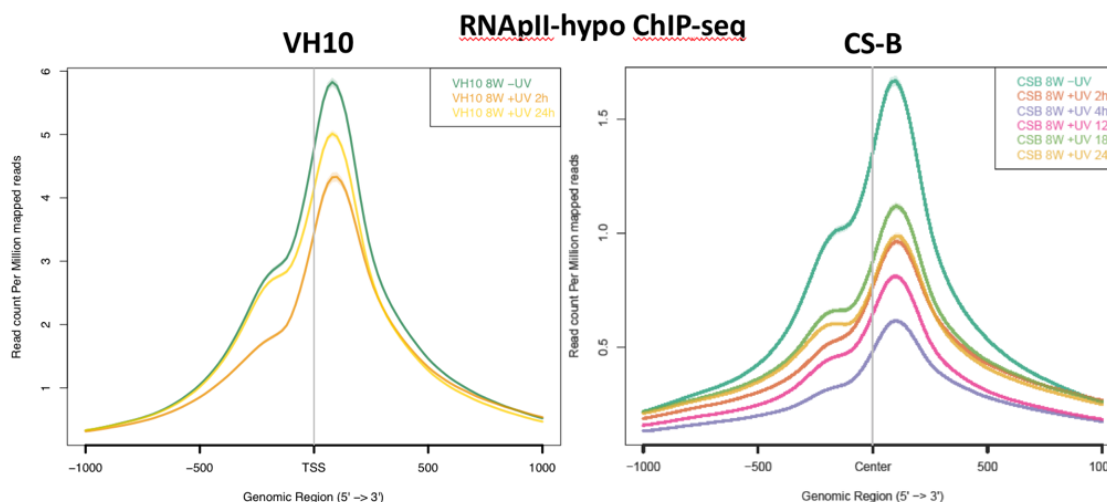
Κατά συνέπεια, η έλλειψη της CSB δημιουργεί έναν συνωστισμό μορίων RNAPII που απελευθερώνονται συνεχώς, αν και με αργούς ρυθμούς, από το σημείο PPP και συσσωρεύονται μαζί με αυτές που έχουν ήδη σταματήσει στα σημεία των βλαβών. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται ακόμα και πολλές ώρες μετά την πρόκληση βλάβης.



Εικόνα 47 Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος της RNAPII-ser2 στα φυσιολογικά (WT) και στα CS-B κύτταρα, 18 ώρες μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε κυτταρική σειρά: 1) κύτταρα επώαστηκαν με DRB για 3 ώρες, χωρίς να εκτεθούν σε UV (θαλασσί, κίτρινο), 2) κύτταρα επώαστηκαν με DRB για 3 ώρες 15 ώρες μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία (τιρκουάζ, σκούρο καφέ) και 3) κύτταρα δεν επώαστηκαν με DRB (μπλε, ανοιχτό καφέ). Οι RNAPII που απελευθερώνονται συνεχόμενα δεν μπορούν να ξεπεράσουν τα σημεία των βλαβών στα μεγάλα γονίδια.

Τέλος, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την επανάκαμψη της έναρξης της μεταγραφής στα CS-B κύτταρα, επαναλάβουμε το CHIP-seq για την υποφωσφορυλιωμένη RNAPII, περιλαμβάνοντας περισσότερα χρονικά σημεία στα CS-B κύτταρα, μετά την επίδραση

της UV ακτινοβολίας. Αρχικά παρατηρήθηκε πτώση της έναρξης, η οποία άρχισε να ανακάμπτει σταδιακά έως τις 18ώρες μετά την έκθεση στη UV (Εικόνα 48).



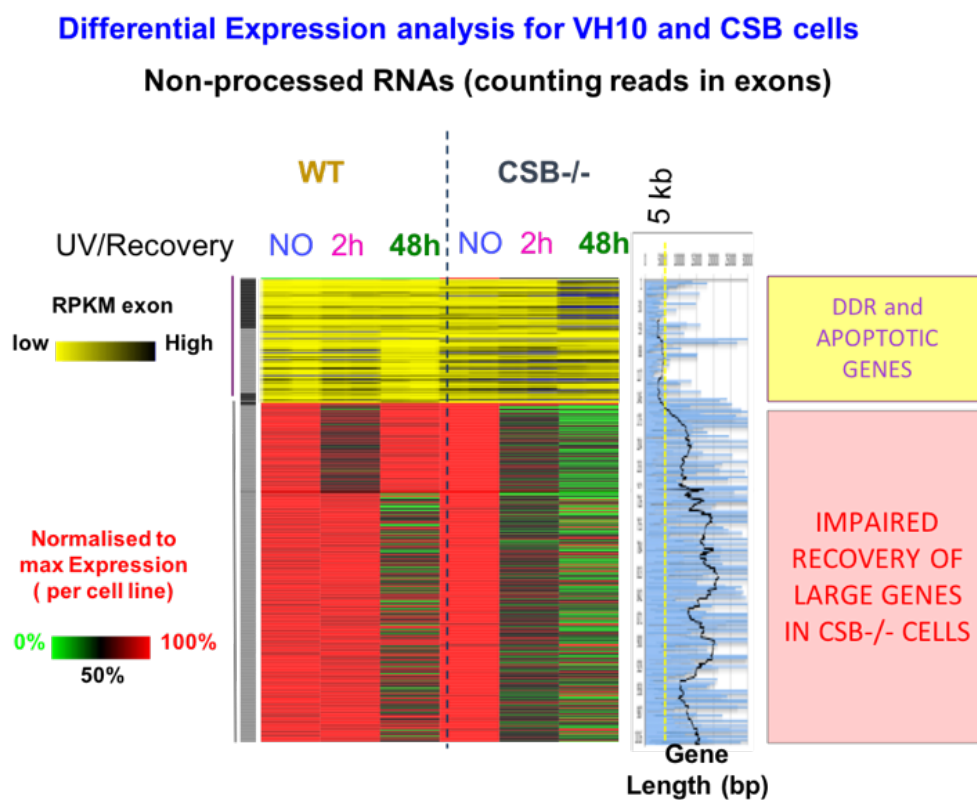
Εικόνα 48 Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος της RNAPII-hypo στα ενεργά γονίδια σε φυσιολογικά και CS-B κύτταρα. Η έναρξη της μεταγραφής παρουσιάζει αρχικά πτώση αποκρινόμενη στη UV ακτινοβολία έπειτα όμως ανακάμπτει στα φυσιολογικά (VH10) αλλά και στα CS-B κύτταρα (18 ώρες). Σκούρο πράσινο: NO UV, πορτοκαλί: 2 ώρες, ανοιχτό πράσινο: 12 ώρες, κίτρινο: 24 ώρες.

Μεταγραφικό προφίλ CS-B κυττάρων

Συμπερασματικά, τα CS-B κύτταρα αποκρινόμενα στη UV ακτινοβολία μεταβάλλουν τους μηχανισμούς ρύθμισης και αναδιοργανώνουν τη μεταγραφή τους. Νέα μόρια RNAPII απελευθερώνονται από τα σημεία ελέγχου PPP στο εσωτερικό των γονιδίων, με σκοπό να αυξηθούν οι πιθανότητες να συναντήσουν τις βλάβες και να τις επιδιορθώσουν, όπως και στα φυσιολογικά κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός είναι πιο αργός στα CS-B κύτταρα και δεν αποδίδει τελικά δεδομένου ότι απουσιάζει η CSB πρωτεΐνη η οποία φαίνεται να κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία. Έτσι οι RNA πολυμεράσες II παραμένουν στα σημεία των βλαβών για 8 ώρες τουλάχιστον, μαζί με το νεοσυντιθέμενο RNA τους. Στα ίδια σημεία συσσωρεύονται και οι RNA πολυμεράσες II που απελευθερώνονται από τα σημεία ελέγχου PPP σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα, καθώς η έναρξη της μεταγραφής εντωμεταξύ ανακάμπτει.

Τελικά στα CS-B κύτταρα δεν πραγματοποιείται λειτουργική μεταγραφή με αποτέλεσμα να στερούνται σημαντικών για την επιβίωσή τους μορίων RNA, και κατά συνέπεια πρωτεϊνών. Όπως είναι φανερό από την παρακάτω mRNA ανάλυση, στα CS κύτταρα ενεργοποιούνται τελικά αποπτωτικά μονοπάτια μέσω των μικρών γονιδίων, τα οποία μεταγράφονται φυσιολογικά καθώς λόγω μεγέθους έχουν μικρή πιθανότητα να έχουν

βλάβες κάτω από τις συγκεκριμένες δόσεις υπεριώδους ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 49).



Εικόνα 49 Heatmap που απεικονίζει τη διαφορετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ των φυσιολογικών (WT) και των CS-B κυττάρων. Τα μικρά σε μήκος γονίδια που συμμετέχουν στην απόπτωση και σε μονοπάτια επιδιόρθωσης μεταγράφονται στα CS-B κύτταρα 48ώρες μετά την έκθεση στη UV ακτινοβολία. Τα μεγάλα σε μήκος γονίδια συσσωρεύουν βλάβες και η μεταγραφή τους δεν είναι δυνατόν να επανέλθει σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ταυτοποιήθηκε ένας νέος μεταβολικός μηχανισμός ο οποίος σχετίζεται με την ενεργή μεταγραφή (Lavigne et al., 2017). Προτείνεται ότι τα κύτταρα αποκρινόμενα στο γενετοξικό στρες, μεταπίπτουν σε μία κατάσταση που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «λειτουργία ασφαλείας της μεταγραφής ή safe mode», με αυξημένη απελευθέρωση της RNAPII-ser2P στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης. Αυτός ο μηχανισμός άμυνας των κυττάρων προάγει μία καθολική, γρήγορη και συγχρονισμένη εκ νέου απελευθέρωση μορίων RNAPII από τις θέσεις παύσης πλησίον των υποκινητών (Proximal Promoter Pausing site- PPP) στο εσωτερικό όλων των ενεργών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά εκπροσωπούν περίπου το 40% του γονιδιώματος. Τα κύτταρα με αυτόν τον τρόπο επωφελούνται καθώς ο αυξημένος αριθμός RNAPII που εκτελούν μεταγραφική επιμήκυνση συμβάλλει στη γρήγορη και ομοιόμορφη ανίχνευση και κατά συνέπεια επιδιόρθωση των βλαβών. Η εύρεση των βλαβών επιτυγχάνεται στην κωδική αλυσίδα και λιγότερο στη μη κωδική, ανεξάρτητα από το ακριβές σημείο των βλαβών και το επίπεδο έκφρασης του κάθε γονιδίου πριν τη βλάβη. Αυτός ο μηχανισμός βασίζεται στην απελευθέρωση νέων κυμάτων μεταγραφής και αναστέλλεται όταν εφαρμόζονται αναστολείς της μεταγραφής, όπως ο DRB αναστολέας. Σε συμφωνία με αυτό, παρατηρείται αυξημένη επιδιορθωτική TC-NER δραστηριότητα στις βλάβες που εντοπίζονται σε περιοχές που έχουν φτάσει οι RNA πολυμεράσες II αυτού του νέου μεταγραφικού κύματος. Τα δεδομένα μας επίσης συσχετίζονται και με κλινικά δεδομένα. Τα γενικευμένα προφίλ απεικόνισης των μεταλλαγών καρκινικών κυττάρων, όπως αυτά του μελανώματος και του αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, που σχετίζονται άμεσα με τον μονοπάτι επιδιόρθωσης NER, χαρακτηρίζονται από χαμηλά και ομοιογενή επίπεδα μεταλλαγών σε όλα τα γονίδια που εκφράζονται σε σχέση με τις μη μεταγραφόμενες περιοχές. Τέλος, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν τη σημασία του σημείου PPP στον έλεγχο της μεταγραφής και εξηγούν πώς τα κύτταρα μπορούν να επωφεληθούν από την υψηλή συγκέντρωση μορίων RNA πολυμεράσης II, που παραμένουν σε αναμονή σε αυτά τα σημεία των ενεργών γονιδίων.

Η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει ξεκάθαρη εικόνα της κατανομής της RNAPII και των διαφορετικών ισομορφών της στο γονιδίωμα (από το προ-εναρκτήριο σύμπλοκο έως την είσοδο στην επιμήκυνση), καθώς και του νεοσυντιθέμενου RNA (nRNA), μετά από την έκθεση των κυττάρων σε χαμηλές δόσης UV ακτινοβολίας.

Επιπλέον, η παρούσα μελέτη εξηγεί τις παρατηρήσεις των άλλων ερευνητικών ομάδων σχετικά με την απόκριση των κυττάρων στην επαγωγή βλαβών (Chen et al., 2008;

Nguyen et al., 2001). Σύμφωνα με αυτές, μετά τη UV ακτινοβολία τα επίπεδα του ενεργού P-TEFb αυξάνονται απότομα στον πυρήνα των κυττάρων. Προτείνουμε ότι μετά το στρες που προκαλεί η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, η απελευθέρωση του P-TEFb οδηγεί σε υπερφωσφορυλίωση του CTD καρβοξυτελικού άκρου της RNAPII, μέσω της δράσης της κινάσης Cdk9. Αυτό οδηγεί σε γενικευμένη και συγχρονισμένη μετάπτωση στην επιμήκυνση της μεταγραφής, σε όλα τα ενεργά γονίδια. Η απομάκρυνση του DRB ενισχύει την εικόνα που παρατηρείται στα πειράματα χωρίς τον αναστολέα, γεγονός που φανερώνει ότι ο αριθμός των RNAPII που θα απελευθερωθούν στο εσωτερικό των γονιδίων εξαρτάται άμεσα από το ποσοστό των RNAPII που βρίσκονται σε αναμονή στα σημεία PPP. Τα αποτελέσματά μας προβάλλουν τον κεντρικό ρόλο του P-TEFb στον μοριακό μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες και εξηγούν πρόσφατα πρωτεωμικά αποτελέσματα (Boeing et al., 2016).

Η απελευθέρωση νέων κυμάτων μεταγραφής μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία διευκρινίζει επίσης τα ευρήματα παλαιότερων μελετών, που ενώ το εντόπιζαν το ερμήνευαν με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα ανέφεραν αυξημένα ποσοστά της RNAPII σε όλα τα ενεργά γονίδια (Gyenis et al., 2014) καθώς και νεοσυντιθέμενου RNA στα 5' άκρα των γονιδίων (Andrade-Lima et al., 2015; Williamson et al., 2017).

Ο προτεινόμενος μηχανισμός έχει ως αποτέλεσμα την άμεση ανίχνευση και επιδιόρθωση των βλαβών στην κωδική αλυσίδα των γονιδίων, αλλά πιθανώς συνεισφέρει και στην αποδιάταξη του DNA, διευκολύνοντας έμμεσα την επιδιόρθωση και της μη κωδικής αλυσίδας από τους παράγοντες του GG-NER. Σε συμφωνία λοιπόν με προηγούμενες μελέτες (Venema et al., 1992) η δομή της ίδιας της χρωματίνης διευκολύνει την επιδιόρθωση των βλαβών, αφού η επιδιόρθωση των μη κωδικών αλυσίδων των ενεργών γονιδίων συμβαίνει πιο γρήγορα σε σχέση με την επιδιόρθωση των μη κωδικών αλυσίδων ανενεργών γονιδίων. Επιπλέον, μία πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η επιδιόρθωση μέσω GG-NER διευκολύνεται όταν η χρωματίνη βρίσκεται σε «ανοιχτή» διάταξη (Adar et al., 2016). Καταλήγουμε επομένως στο συμπέρασμα ότι η αποδιάταξη της χρωματίνης στις γονιδιακές περιοχές μέσω της πορείας του μεταγραφικού κύματος αυξάνει την προσβασιμότητα των παραγόντων επιδιόρθωσης όχι μόνο του TC-NER αλλά και του GG-NER μονοπατιού.

Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία έχει σχετιστεί με βλάβες στο DNA που επιδιορθώνονται μέσω του TC-NER. Το ίδιο συμβαίνει και για τις βλάβες που προκαλούνται από τον καπνό του τσιγάρου. Στις περιπτώσεις καρκινικών όγκων μελανώματος και αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, που σχετίζονται άμεσα με τους παραπάνω περιβαλλοντικούς παράγοντες, έχουν βρεθεί μεταλλαγές σχετιζόμενες με τον NER μηχανισμό (Alexandron et al., 2013; Martincorena and Campbell, 2015). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η πιθανότητα

μετάλλαξης είναι μειωμένη στις κωδικές αλυσίδες των γονιδίων που εκφράζονται, σε σχέση με αυτά που δεν εκφράζονται και ανεξάρτητη από το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει στα κύτταρα που καθημερινά έρχονται σε επαφή με μεταλλαξογόνους παράγοντες να αποκρίνονται άμεσα στις βλάβες που προκαλούνται στο γενετικό τους υλικό. Επίσης, τα κύτταρα τα οποία διαιρούνται με γρήγορους ρυθμούς ενδεχομένως να είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση σε μεταλλαξογόνους παράγοντες, ώστε να ενεργοποιείται άμεσα η κατάσταση “λειτουργίας ασφαλείας ή safe mode”. Έτσι οι πιθανότητες διόρθωσης αυτών των βλαβών μεγιστοποιούνται και παρεμποδίζεται η μεταβίβαση των μεταλλαγών στις επόμενες γενιές κυττάρων και επομένως η καρκινογένεση (Liakos et al., 2017).

Η παρούσα μελέτη αποκάλυψε έναν νέο μηχανισμό απελευθέρωσης μορίων RNA πολυμεράσης II από τις PPP περιοχές στο εσωτερικό των ενεργών γονιδίων. Ο μηχανισμός αυτός ενισχύει την επιδιόρθωση αυτών των γονιδίων και εξασφαλίζει τη γονιδιακή ακεραιότητα. Ενδεχόμενες δυσλειτουργίες στο μονοπάτι της επιμήκυνσης της μεταγραφής ή/και στο TC-NER μονοπάτι, καθιστούν τα κύτταρα περισσότερο επιρρεπή σε μεταλλάξεις.

Συγκεκριμένα στα CS-B κύτταρα, στα οποία το μονοπάτι του TC-NER είναι ελαττωματικό, διαφαίνεται η σημασία του παραπάνω μηχανισμού. Τα κύτταρα αυτά, αποκρινόμενα στην υπεριώδη ακτινοβολία, ενεργοποιούν τους ίδιους μοριακούς μηχανισμούς με τα φυσιολογικά, και έτσι ξεκινά ένα νέο κύμα μεταγραφής. Το νέο αυτό κύμα έχει ως σκοπό να εντοπίσει και να επιδιορθώσει τις βλάβες που προκλήθηκαν στα ενεργά γονίδια. Ωστόσο, η έλλειψη της CSB πρωτεΐνης μειώνει την ταχύτητα απελευθέρωσης των μορίων της RNAPII από τις PPP περιοχές στο εσωτερικό των γονιδίων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την πρόσδεση της CSB στις PPP περιοχές ελέγχου, προτείνει έναν νέο ρόλο της CSB πρωτεΐνης στον έλεγχο της ενεργής μεταγραφής υπό συνθήκες γενετοξικού στρες. Ακολούθως, καθώς οι RNAPII ανιχνεύουν τις βλάβες σταματούν στα σημεία αυτά έως ότου αυτές επιδιορθωθούν. Η έλλειψη όμως της CSB αναστέλλει την επιδιόρθωσή τους. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός απελευθέρωσης νέων πολυμερασών από τις PPP περιοχές δεν παύει, και μάλιστα ενισχύεται με την ανάκαμψη της έναρξης της μεταγραφής. Νέα μόρια RNAPII περνούν διαδοχικά από την έναρξη στην επιμήκυνση, μέσω των PPP περιοχών, και συσσωρεύονται στα σημεία των βλαβών όπου παραμένουν για τουλάχιστον 8 ώρες. Τα κύτταρα συνεχίζουν να βρίσκονται στην κατάσταση «ασφαλούς λειτουργίας» όσο οι βλάβες δεν επιδιορθώνονται και συνεπώς η μεταγραφή δεν είναι δυνατόν να αποκατασταθεί. Αφού ο παραπάνω μηχανισμός δεν λειτουργεί, τα κύτταρα εξακολουθούν να ξοδεύουν σημαντικά ποσά ενέργειας και τελικά ενεργοποιούνται τα αποπτωτικά μοριακά μονοπάτια.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνάδουν με τον πολύπλοκο φαινότυπο των ασθενών με σύνδρομο Cockayne. Κατά την ανάπτυξη αυτών, οι βλάβες που προκαλούνται στα κύτταρα πολλών διαφορετικών ιστών από εξωτερικούς αλλά και εσωτερικούς παράγοντες οδηγούν στην παραπάνω κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων, η οποία εξηγεί σε σημαντικό βαθμό τον παρατηρούμενο νευροεκφυλισμό και την αποτυχία ανάπτυξης.

Τέλος τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποσαφηνίζουν τον ρόλο των CS πρωτεϊνών στην καρκινογένεση. Αφού οι CS ασθενείς δεν διαθέτουν λειτουργικό TC-NER μονοπάτι, θα ήταν αναμενόμενο να συσσωρεύουν γονιδιακές μεταλλάξεις, οι οποίες τελικά θα οδηγούσαν στην ανάπτυξη καρκίνου. Ωστόσο, στο CS σύνδρομο δεν παρατηρείται αυτός ο φαινότυπος. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τον παρακάτω μηχανισμό. Το νέο κύμα μεταγραφής που αποτυγχάνει να διασφαλίσει τη γονιδιακή ακεραιότητα σε συνδυασμό με τη μη ελεγχόμενη διαδοχική απελευθέρωση νέων μορίων RNAPII στο εσωτερικό των γονιδίων οδηγούν σε απόπτωση των CS κυττάρων. Έτσι, τα κύτταρα «θυσιάζονται» και η βλάβη δεν μεταβιβάζεται στις επόμενες γενιές. Καθώς όμως ο οργανισμός βρίσκεται σε φάση έντονης διαφοροποίησης και ταχύτατης ανάπτυξης, τα κύτταρα πρέπει να διαιρούνται συνεχώς με αποτέλεσμα η απώλειά τους να προκαλεί τον συνολικό φαινότυπο κατάρρευσης του συνδρόμου.

Συμπερασματικά, η ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA αποτελεί κινητήριο δύναμη για την ανάπτυξη καρκίνου, καθώς οι συνεχείς μεταλλάξεις και η μη ομαλή έκφραση των γονιδίων αποτελούν την καρδιά ανάπτυξης του όγκου. Η κυτταρική γήρανση και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τη γενωμική ακεραιότητα των σωματικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους απαιτούν ένα λειτουργικό δίκτυο απόκρισης στις βλάβες του DNA και συχνά εξαρτώνται από τα μονοπάτια επιδιόρθωσής του. Αυτά τα μονοπάτια είναι διαφορετικά από αυτά που αρχικώς ήταν ελαττωματικά και οδήγησαν στην ανάπτυξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, πολλοί από τους παράγοντες που συμμετέχουν στον επιδιορθωτικό μηχανισμό μέσω του TC-NER έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται σε όγκους που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία (Liakos et al., 2017). Προς αυτή την κατεύθυνση και αξιοποιώντας πρόσφατα τεχνολογικά επιτεύγματα, καθίσταται δυνατή η θεραπευτική εκμετάλλευση της εξάρτησης των καρκινικών κυττάρων από ένα συγκεκριμένο επιδιορθωτικό μονοπάτι. Αυτή η εξάρτηση μπορεί να αποτελέσει και την «Αχίλλειο πτέρνα» του καρκίνου. Αναλυτικότερα, αναστολή του συγκεκριμένου μονοπατιού μπορεί να αποτρέψει την αποκατάσταση των ενδογενών βλαβών που συμβαίνουν κατά τον διπλασιασμό του DNA, αλλά και να αυξήσει την

αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας. Αναλογιζόμενοι τις σοβαρές τοξικές παρενέργειες των κλασικών αντικαρκινικών φαρμάκων αλλά και την ανθεκτικότητα των όγκων στις αντίστοιχες αντικαρκινικές θεραπείες, καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών στόχων αλλά και νέων θεραπευτικών συνδυασμών. Για παράδειγμα, η φαρμακευτική αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα με ταυτόχρονη πρόκληση βλαβών, μέσω των ήδη χρησιμοποιούμενων θεραπευτικών σχημάτων, μπορεί να επιφέρει βελτίωση και να μειώσει σημαντικά τη δόση του χορηγούμενου πρωτογενούς φαρμάκου. Η παραπάνω στρατηγική μπορεί να οδηγήσει τελικά σε πιο ασφαλή και καλύτερα ανεκτά χημειοθεραπευτικά σχήματα.

Συνεπώς μελέτες όπως η παρούσα συμβάλλουν στη διαλεύκανση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών του CS συνδρόμου και προτείνουν νέα μονοπάτια διερεύνησης για επιτυχημένη θεραπεία του καρκίνου.

Ευρετήριο Συντμήσεων

Σύνδρομα

CS	Cockayne Syndrome
COFS	Cerebro Oculo Facio Skeletal Syndrome
TTD	Trichothiodystrophy
XP	Xeroderma pigmentosum

Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί

BER	Base excision repair
NER	Nucleotide Excision Repair
GG-NER	Global Genome Repair
TC- NER	Transcription-Coupled Repair

Πρωτεΐνες

CFI	Cleavage Factor I
CFII	Cleavage Factor II
CPA	Cleavage and Polyadenylation factors
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factors
CSA	Cockayne Syndrome protein A
CSB	Cockayne Syndrome protein B
CstF	Cleavage stimulatory Factor
DSIF	DRB Sensitivity- Inducing Factor
HMG1	High Mobility Group Nucleosome binding 1
mtRNAPolI	Mitochondrial polymerase I
NELF	Negative Elongation Factor
NuRD	Nucleosome remodeling and deacetylation complex
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
RNAPII	RNA polymerase II
RNAPII-Hypo	Hypo- phosphorylated RNA polymerase II
RNAPII-Ser5P	serine 5- phosphorylated RNA polymerase II
RNAPII-Ser2P	serine 2- phosphorylated RNA polymerase II
RPA	Replication Protein A
UV-DDB1/DDB2	UV- damaged DNA- binding protein 1/2
UVSSA	UV- stimulated scaffold protein A
USP7	ubiquitin- specific- processing protease 7
XPA/ XPB/ XPC/ XPD/ XPE/ XPF/ XPG/ XPV	Xeroderma Pigmentosum protein A, B, C, D, E, F, G, V
XAB2	XPA binding protein 2
XRN2	5'-3' Exoribonuclease 2

Κύτταρα

CS1AN hTERT / CS-B	αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος από ασθενείς με σύνδρομο CS
VH10 hTERT / VH25 hTERT	φυσιολογικοί αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος

Τεχνικές

ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
Gro- seq	Global Run-on Sequencing
mRNA- seq	messenger RNA sequencing
nRNA- seq	nascent RNA sequencing
rtPCR / qPCR	Real-time/ quantitative polymerase chain reaction
CPDIP	CPD Immunoprecipitation
cDNA synthesis	complementary DNA synthesis

Λοιποί συμβολισμοί

CPDs	Cyclobutane Pyrimidine Dimers
CTD	carboxy-terminal domain
DSB	double strand breaks
DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole
EI	Escape Index
EU	Ethylene Uridine
PAS	Poly (A) Site
PPP	Proximal Promoter Pausing Sites
RBX1	RING-box 1
TSS	Transcription Start Site
TT	διμερή θυμίνης
UV-C	Ultraviolet-C irradiation
WT	Wild type

Βιβλιογραφία

Aamann, M.D., Sorensen, M.M., Hvitby, C., Berquist, B.R., Muftuoglu, M., Tian, J., de Souza-Pinto, N.C., Scheibye-Knudsen, M., Wilson, D.M., Stevnsner, T., et al. (2010). Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *FASEB J.* *24*, 2334–2346.

Aamann, M.D., Muftuoglu, M., Bohr, V.A., and Stevnsner, T. (2013). Multiple interaction partners for Cockayne syndrome proteins: Implications for genome and transcriptome maintenance. *Mech. Ageing Dev.* *134*, 212–224.

Adar, S., Hu, J., Lieb, J.D., and Sancar, A. (2016). Genome-wide kinetics of DNA excision repair in relation to chromatin state and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E2124–E2133.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* *500*, 415–421.

Andrade-Lima, L.C., Veloso, A., Paulsen, M.T., Menck, C.F.M., and Ljungman, M. (2015). DNA repair and recovery of RNA synthesis following exposure to ultraviolet light are delayed in long genes. *Nucleic Acids Res.* *43*, 2744–2756.

Anindya, R., Mari, P.-O., Kristensen, U., Kool, H., Giglia-Mari, G., Mullenders, L.H., Foustner, M., Vermeulen, W., Egly, J.-M., and Svejstrup, J.Q. (2010). A Ubiquitin-Binding Domain in Cockayne Syndrome B Required for Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell* *38*, 637–648.

Balajee, A.S., May, A., Dianov, G.L., Friedberg, E.C., and Bohr, V.A. (1997). Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 4306–4311.

Beerens, N., Hoeijmakers, J.H.J., Kanaar, R., Vermeulen, W., and Wyman, C. (2005). The CSB Protein Actively Wraps DNA. *J. Biol. Chem.* *280*, 4722–4729.

Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., and Meisterernst, M. (2010). RNA Polymerase II C-terminal Heptarepeat Domain Ser-7 Phosphorylation Is Established in a Mediator-dependent Fashion. *J. Biol. Chem.* *285*, 188–196.

Boeing, S., Williamson, L., Encheva, V., Gori, I., Saunders, R.E., Instrell, R., Aygün, O., Rodriguez-Martinez, M., Weems, J.C., Kelly, G.P., et al. (2016). Multiomic Analysis of the UV-Induced DNA Damage Response. *Cell Rep.*

van den Boom, V., Citterio, E., Hoogstraten, D., Zotter, A., Egly, J.-M., van Cappellen, W.A., Hoeijmakers, J.H.J., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2004). DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J. Cell Biol.* *166*, 27.

Bradsher, J., Auriol, J., de Santis, L.P., Iben, S., Vonesch, J.-L., Grummt, I., and Egly, J.-M. (2002). CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol. Cell* *10*, 819–829.

Brosh, R.M., Balajee, A.S., Selzer, R.R., Sunesen, M., De Santis, L.P., and Bohr, V.A. (1999). The ATPase domain but not the acidic region of Cockayne syndrome group B gene product is

essential for DNA repair. *Mol. Biol. Cell* 10, 3583–3594.

Bukowska, B., and Karwowski, B.T. (2018). Actual state of knowledge in the field of diseases related with defective nucleotide excision repair. *Life Sci.* 195, 6–18.

Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle. *Mol. Cell* 36, 541–546.

Chatre, L., Biard, D.S.F., Sarasin, A., and Ricchetti, M. (2015). Reversal of mitochondrial defects with CSB-dependent serine protease inhibitors in patient cells of the progeroid Cockayne syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E2910–E2919.

Chen, R., Liu, M., Li, H., Xue, Y., Ramey, W.N., He, N., Ai, N., Luo, H., Zhu, Y., Zhou, N., et al. (2008). PP2B and PP1 cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺ signaling. *Genes Dev.* 22, 1356–1368.

Christiansen, M. (2003). Functional consequences of mutations in the conserved SF2 motifs and post-translational phosphorylation of the CSB protein. *Nucleic Acids Res.* 31, 963–973.

Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H., and Vermeulen, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7643–7653.

Compe, E., and Egly, J.-M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 343–354.

Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008). Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science* 322, 1845–1848.

Dianov, G.L., Houle, J.-F., Iyer, N., Bohr, V.A., and Friedberg, E.C. (1997). Reduced RNA polymerase II transcription in extracts of cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 3636–3642.

Fassihi, H., Sethi, M., Fawcett, H., Wing, J., Chandler, N., Mohammed, S., Craythorne, E., Morley, A.M.S., Lim, R., Turner, S., et al. (2016). Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1236–E1245.

Ferrari, F., Plachetka, A., Alekseyenko, A.A., Jung, Y.L., Ozsolak, F., Kharchenko, P.V., Park, P.J., and Kuroda, M.I. (2013). “Jump Start and Gain” Model for Dosage Compensation in *Drosophila* Based on Direct Sequencing of Nascent Transcripts. *Cell Rep.* 5, 629–636.

Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2006). Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. *Mol. Cell* 23, 471–482.

Gilmour, D.S., and Fan, R. (2009). Detecting transcriptionally engaged RNA polymerase in eukaryotic cells with permanganate genomic footprinting. *Methods* 48, 368–374.

van Gool, A.J., van der Horst, G.T., Citterio, E., and Hoeijmakers, J.H. (1997). Cockayne syndrome: defective repair of transcription? *EMBO J.* 16, 4155–4162.

- Vermeulen, W. and Fousteri M. (2013). Mammalian Transcription-Coupled Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(8): a012625.
- Greenhaw, G.A., Hebert, A., Duke-Woodside, M.E., Butler, I.J., Hecht, J.T., Cleaver, J.E., Thomas, G.H., and Horton, W.A. (1992). Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome: overlapping clinical and biochemical phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 677.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The Ubiquitin Ligase Activity in the DDB2 and CSA Complexes Is Differentially Regulated by the COP9 Signalosome in Response to DNA Damage. *Cell* 113, 357–367.
- Gyenis, Á., Umlauf, D., Újfaludi, Z., Boros, I., Ye, T., and Tora, L. (2014). UVB Induces a Genome-Wide Acting Negative Regulatory Mechanism That Operates at the Level of Transcription Initiation in Human Cells. *PLoS Genet.* 10, e1004483.
- Haradhvala, N.J., Polak, P., Stojanov, P., Covington, K.R., Shinbrot, E., Hess, J.M., Rheinbay, E., Kim, J., Maruvka, Y.E., Braunstein, L.Z., et al. (2016). Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. *Cell* 164, 538–549.
- Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2007). Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II Plays Central Roles in the Integrated Events of Eucaryotic Gene Expression. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 601–608.
- Hu, J., Adar, S., Selby, C.P., Lieb, J.D., and Sancar, A. (2015). Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution. *Genes Dev.* 29, 948–960.
- Hu, J., Adebali, O., Adar, S., and Sancar, A. (2017). Dynamic maps of UV damage formation and repair for the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201706522.
- Kamileri, I., Karakasilioti, I., and Garinis, G.A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet.* 28, 566–573.
- Karikkineeth, A.C., Scheibye-Knudsen, M., Fivenson, E., Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (2017). Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Ageing Res. Rev.* 33, 3–17.
- Kingston, R.E., and Narlikar, G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339–2352.
- Kleijer, W.J., Laugel, V., Berneburg, M., Nardo, T., Fawcett, H., Gratchev, A., Jaspers, N.G.J., Sarasin, A., Stefanini, M., and Lehmann, A.R. (2008). Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair* 7, 744–750.
- Kraemer, K.H., Patronas, N.J., Schiffmann, R., Brooks, B.P., Tamura, D., and DiGiovanna, J.J. (2007). Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: A complex genotype–phenotype relationship. *Neuroscience* 145, 1388–1396.

Kubota, M., Ohta, S., Ando, A., Koyama, A., Terashima, H., Kashii, H., Hoshino, H., Sugita, K., and Hayashi, M. (2015). Nationwide survey of Cockayne syndrome in Japan: Incidence, clinical course and prognosis: Cockayne syndrome in Japan. *Pediatr. Int.* *57*, 339–347.

Lake, R.J., Geyko, A., Hemashettar, G., Zhao, Y., and Fan, H.-Y. (2010). UV-Induced Association of the CSB Remodeling Protein with Chromatin Requires ATP-Dependent Relief of N-Terminal Autorepression. *Mol. Cell* *37*, 235–246.

Lake, R.J., Basheer, A., and Fan, H.-Y. (2011). Reciprocally Regulated Chromatin Association of Cockayne Syndrome Protein B and p53 Protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 34951–34958.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* *10*.

Latini, P., Frontini, M., Caputo, M., Gregan, J., Cipak, L., Filippi, S., Kumar, V., Vélez-Cruz, R., Stefanini, M., and Proietti-De-Santis, L. (2011). CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* *10*, 3719–3730.

Laugel, V., Dalloz, C., Durand, M., Sauvanaud, F., Kristensen, U., Vincent, M.C., Pasquier, L., Odent, S., Cormier-Daire, V., Gener, B., et al. (2010). Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum. Mutat.* *31*, 113–126.

Lavigne, M.D., Konstantopoulos, D., Ntakou-Zamplara, K.Z., Liakos, A., and Fousteri, M. (2017). Global unleashing of transcription elongation waves in response to genotoxic stress restricts somatic mutation rate. *Nat. Commun.* *8*, 2076.

Levine, M. (2011). Paused RNA Polymerase II as a Developmental Checkpoint. *Cell* *145*, 502–511.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *25*, 1754–1760.

Liakos, A., Lavigne, M., and Fousteri, M. (2017). Nucleotide Excision Repair: From Neurodegeneration to Cancer. In *Personalised Medicine*, S. El-Khamisy, ed. (Springer International Publishing), pp. 17–39.

Licht, C.L., Stevnsner, T., and Bohr, V.A. (2003). Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am. J. Hum. Genet.* *73*, 1217–1239.

Mao, P., Smerdon, M.J., Roberts, S.A., and Wyrick, J.J. (2016). Chromosomal landscape of UV damage formation and repair at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 9057–9062.

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 465–481.

Martincorena, I., and Campbell, P.J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* *349*, 1483–1489.

Moriwaki, S. (2013). Hereditary Disorders with Defective Repair of UV-Induced DNA Damage.

Jpn. Clin. Med. 4, JCM.S10730.

Muftuoglu, M. (2006). Cockayne syndrome group B protein has novel strand annealing and exchange activities. *Nucleic Acids Res.* 34, 295–304.

Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.-P., Khaw, M.-C., Saijo, M., Kodo, N., et al. (2000). XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 34931–34937.

Nance, M.A., and Berry, S.A. (1992). Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am. J. Med. Genet.* 42, 68–84.

Newman, J.C., Bailey, A.D., and Weiner, A.M. (2006). Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9613–9618.

Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A., and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322–325.

Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.-L., Ordóñez, G.R., Bignell, G.R., et al. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 463, 191–196.

Porrua, O., and Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 190–202.

Proietti-De-Santis, L., Drané, P., and Egly, J.-M. (2006). Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J.* 25, 1915–1923.

Proudfoot, N.J. (2016). Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. *Science* 352, aad9926-aad9926.

Sainsbury, S., Bernecky, C., and Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 129–143.

Sarker, A.H., Tsutakawa, S.E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D.S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J.A., Nogales, E., and Cooper, P.K. (2005). Recognition of RNA Polymerase II and Transcription Bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: Insights for Transcription-Coupled Repair and Cockayne Syndrome. *Mol. Cell* 20, 187–198.

Scheibye-Knudsen, M., Ramamoorthy, M., Sykora, P., Maynard, S., Lin, P.-C., Minor, R.K., Wilson, D.M., Cooper, M., Spencer, R., de Cabo, R., et al. (2012). Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *J. Exp. Med.* 209, 855–869.

Selby, C.P., and Sancar, A. (1997). Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11205–11209.

Sikorski, T.W., and Buratowski, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 344–351.

Smith, E., and Shilatifard, A. (2013). Transcriptional elongation checkpoint control in development and disease. *Genes Dev.* *27*, 1079–1088.

Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Längst, G., and Grummt, I. (2001). NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J.* *20*, 4892–4900.

Tamkun, J.W. (2007). Stalled polymerases and transcriptional regulation. *Nat. Genet.* *39*, 1421.

Tantin, D., Kansal, A., and Carey, M. (1997). Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6803–6814.

Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 105–178.

Tresini, M., Warmerdam, D.O., Kolovos, P., Snijder, L., Vrouwe, M.G., Demmers, J.A.A., van IJcken, W.F.J., Grosveld, F.G., Medema, R.H., Hoeijmakers, J.H.J., et al. (2015). The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling. *Nature* *523*, 53–58.

Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1992). ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* *71*, 939–953.

Venema, J., Bartosova, Z., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (1992). Transcription affects the rate but not the extent of repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the human adenosine deaminase gene. *J. Biol. Chem.* *267*, 8852–8856.

Williamson, L., Saponaro, M., Boeing, S., East, P., Mitter, R., Kantidakis, T., Kelly, G.P., Lobley, A., Walker, J., Spencer-Dene, B., et al. (2017). UV Irradiation Induces a Non-coding RNA that Functionally Opposes the Protein Encoded by the Same Gene. *Cell*.

Wilson, B.T., Stark, Z., Sutton, R.E., Danda, S., Ekbote, A.V., Elsayed, S.M., Gibson, L., Goodship, J.A., Jackson, A.P., Keng, W.T., et al. (2016). The Cockayne Syndrome Natural History (CoSyNH) study: clinical findings in 102 individuals and recommendations for care. *Genet. Med.* *18*, 483–493.

Xie, W., Ling, T., Zhou, Y., Feng, W., Zhu, Q., Stunnenberg, H.G., Grummt, I., and Tao, W. (2012). The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8161–8166.

Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., and Zhou, Y. (2007). Activation of RNA Polymerase I Transcription by Cockayne Syndrome Group B Protein and Histone Methyltransferase G9a. *Mol. Cell* *27*, 585–595.

Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., et al. (2012). Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat. Genet.* *44*, 593–597.

