

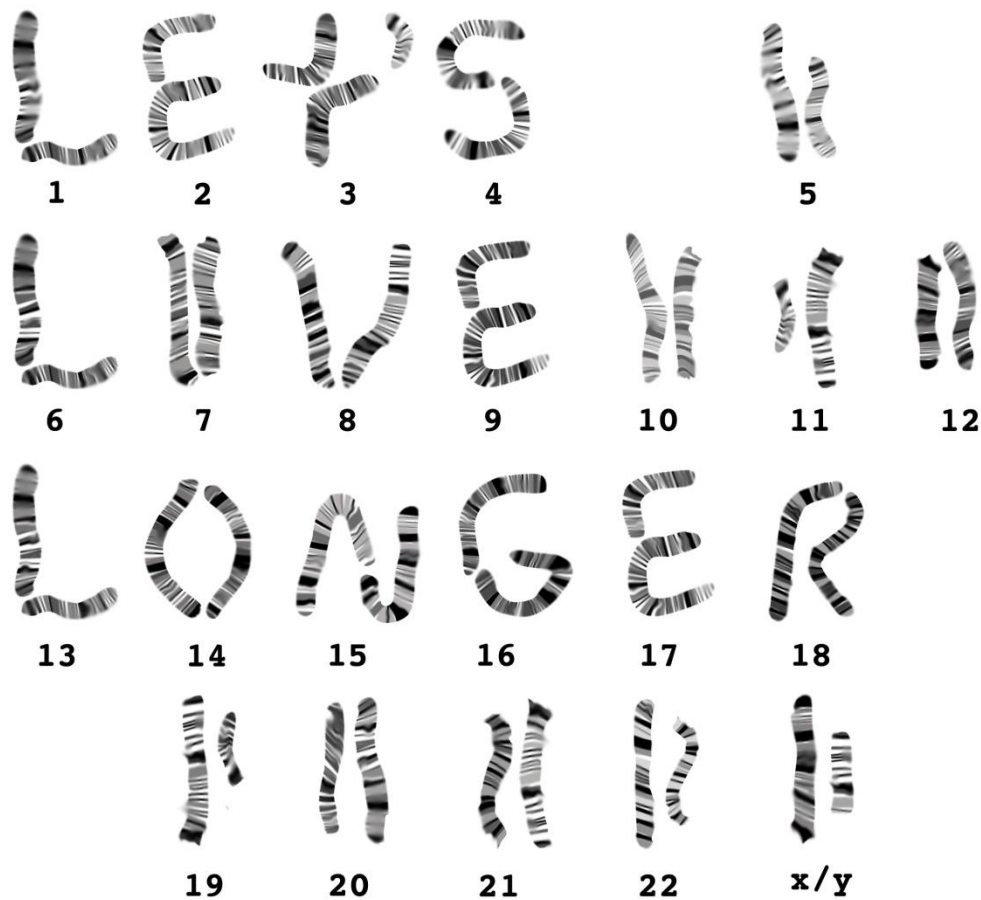


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

**Διερεύνηση Μηχανισμών Χρωμοσωμικής Αστάθειας και
Τελομερικής Ομοιόστασης κατά την Επαγωγή Καρκινικών
Βλαστικών Κυττάρων In vitro και In vivo.**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΗ ΦΑΝΗ-ΜΑΡΛΕΝ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ : 09/01/2013

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 26/03/2013

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ : 12/05/2013

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ 7ΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 04/07/2019

Η συμβουλευτική επιτροπή που ορίστηκε από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στις 26/03/2013 είναι :

Κουλούκουσα Μυρσίνη- Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κοτσίνας Αθανάσιος- Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γκάγκος Σαράντης- Ερευνητής Β', Εργαστήριο Χρωμοσωμικής Αστάθειας και Τελομερικής Δυσλειτουργίας στον Καρκίνο, εργαστήριο Γενετικής, Κέντρο Βασικής Έρευνας ΙΙ, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Η Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στις 12/05/2013 καθόρισε ως θέμα της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος Ρουμελιώτη Φανή-Μάρλεν, το εξής:

«Διερεύνηση μηχανισμών χρωμοσωμικής αστάθειας και τελομερικής ομοιόστασης κατά την επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων in vitro και in vivo»

Η 7μελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στις 04/07/2019 είναι οι κ.κ. :

1. Γοργούλης Βασίλειος
2. Κουλούκουσα- Γιάννιου Μυρσίνη
3. Κοτσίνας Αθανάσιος
4. Χαβάκη Σοφία
5. Πατέρας Ιωάννης
6. Γκάγκος Σαράντης
7. Κλινάκης Απόστολος

Περιεχόμενα

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ	2
<i>A. Εισαγωγή</i>	6
A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ	7
A.1.1 Δομή των τελομερών	7
A.1.2 Τελομερικό μήκος και το πρόβλημα της αντιγραφής των τελομερών (End Replication Problem)	8
A.1.3 Τελομερική θηλιά (t-loop).....	9
A.1.4 Πρωτεϊνικό σύμπλοκο Σελτερίνης (Shelterin Complex)	10
A.1.5 Τελομερική λειτουργία	12
A.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ.....	12
A.2.1 Τελομεράση.....	12
A.2.2.1 Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (ALT)	14
A.2.2.2 Ο ALT μηχανισμός στα φυσιολογικά κύτταρα.....	15
A.2.3 Μεταθετά στοιχεία	15
A.3 ΣΧΕΣΗ ΤΕΛΟΜΕΡΙΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	16
A.3.1 Χαρακτηριστικά νεοπλασιών	16
A.3.2 Χρωμοσωμική αστάθεια	16
A.3.3 Το αυτοτροφοδοτούμενο φαινόμενο «breakage-fusion-bridgecycle».....	17
A.3.4 Πλεονεκτήματα κυττάρων που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό	18
A.3.5.1 Ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς NR2C/F.....	19
A.3.5.2 Οι NR2C/F στον ALT μηχανισμό	20
A.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΔΙΚΛΩΝΟΥ DNA.....	20
A.4.1 Μη-ομόλογος ανασυνδυασμός (Non-homologous End Joining, NHEJ)	21

A.4.2 Ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous recombination, HR)	23
A.4.2.1 DSB μονοπάτι επιδιόρθωσης (DSB repair pathway, DSBR) και Ανασύνδεση κλώνου που εξαρτάται από σύνθεση DNA (Synthesis-dependent Strand Annealing, SDSA).....	24
A.4.2.2 Ανασύνδεση μονού κλώνου (Single Strand Annealing, SSA).....	25
A.5 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΘΡΑΥΞΕΙΣ ΔΙΚΛΩΝΟΥ DNA (Break-induced Replication, BIR).....	26
A.5.1 Πιθανοί μηχανισμοί BIR	28
A.5.2 Σύνδεση ALT και BIR μηχανισμού	29
A.5.3 Ο BIR μηχανισμός στον άνθρωπο	30
A.6 ΣΚΟΠΟΣ	32
<i>B. Υλικά και Μέθοδοι</i>	33
B.1 Διατήρηση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	34
B.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων	34
B.1.2 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη κυττάρων	35
B.1.3 Ακτινοβολήση κυττάρων.....	35
B.2 Συλλογή μεταφασικών χρωμοσωμάτων	36
B.3 Φθορίζοντας In Situ υβριδισμός -FISH στα τελομερή (PNA-FISH).....	36
B.4 Ποσοτικοποίηση τελομερικού μήκους μέσω φθορίζοντα In situ υβριδισμού (Q-FISH).....	38
B.5 Προσδιορισμός του χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού με φθορίζοντα in-situ υβριδισμό (CO-FISH).....	39
B.6 Πολυχρωματική ανάλυση φθορίζοντα in-situ υβριδισμού (M-FISH-multicolor fluorescence in situ hybridization)	42
B.7 Συνδυασμός πολυχρωματικής- τελομερικής και κεντρομεριδιακής ανάλυσης με τη χρήση του φθορίζοντα in-situ υβριδισμού	43
B.8 Ακολουθία πειραμάτων τριπλού FISH	43
<i>B.9 Μικροσκοπική παρατήρηση</i>	44
B.10 Στατιστική ανάλυση	44

<i>Γ. Αποτελέσματα</i>	45
Γ.1 Η τελομερική παρείσφρηση μέσω πυρηνικών υποδοχέων σε ALT καρκίνους οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια.....	46
Γ.1.1 NR2C/F επαγόμενες τελομερικές παρεισφρήσεις σε σημεία θραύσεων δίκλωνου DNA σχετίζονται με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις σε ALT κύτταρα.....	47
Γ.2 Ο ALT μηχανισμός στα ανθρώπινα κύτταρα είναι διαδικασία συντηρητικού τρόπου αντιγραφής του DNA με χαρακτηριστικά BIR	49
Γ.2.1 Ανθρώπινα ALT τελομερή παρουσιάζουν εκτεταμένα τμήματα συντηρητικά συντιθέμενου DNA	50
Γ.2.2 Απώλεια έκφρασης των PolD3 και PolD4 καταστέλλει τη συντηρητική αντιγραφή και επηρεάζει την τελομερική λειτουργία	54
<i>Δ. Συζήτηση</i>	58
<i>Ε. Βιβλιογραφία</i>	62
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	Error! Bookmark not defined.

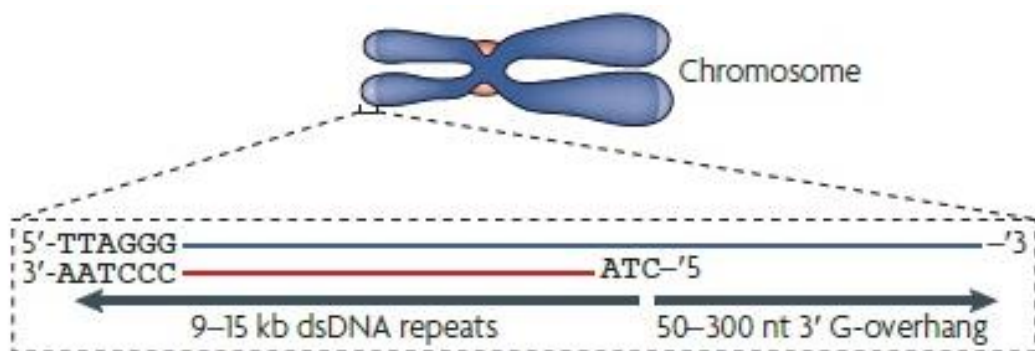
A. Εισαγωγή

A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

A.1.1 Δομή των τελομερών

Τα τελομερή ορίζονται ως νουκλεοπρωτεϊνικές δομές εντοπισμένες στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων (Bolzan & Bianchi, 2006) και περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1938 από τον γενετιστή Dr. Hermann Joseph Müller, ο οποίος μελέτησε την γενετική της φρουτόμυγας (*Drosophila melanogaster*). Ο Müller πρότεινε ότι τα άκρα των χρωμοσωμάτων αποτελούν ξεχωριστές δομές από το υπόλοιπο χρωμόσωμα και τα ονόμασε .telomeres. από το telo = άκρο και το mere = μέρος (Müller, 1938).

Το ανθρώπινο τελομερές αποτελείται από πρωτεΐνες και διαδοχικές επαναλήψεις της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας (5'-TTAGGG-3'/3'-AATCCC-5')n με προσανατολισμό 5'-3' (Meyne et al., 1989). Οι νουκλεοτιδικές επαναλήψεις αρχικά απαρτίζονται από δίκλωνο τμήμα DNA και καταλήγουν σε μονόκλιωνα 3' άκρα του χρωμοσώματος, πλούσια σε μόρια γουανίνης (G-rich overhang)(Blasco, 2005, Bolzan & Bianchi, 2006), με μήκος περίπου 50-300 νουκλεοτίδια (O'Sullivan & Karlseder, 2010). Τα τελομερή των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων στα σωματικά κύτταρα κυμαίνονται σε μέγεθος από 9 έως 15 κιλοβάσεις ανάλογα με την ηλικία του ανθρώπου και τον τύπο του κυττάρου (O'Sullivan & Karlseder, 2010, de Lange et al., 1990)(Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Δομή τελομερούς (O'Sullivan and Karlseder, 2010)

A.1.2 Τελομερικό μήκος και το πρόβλημα της αντιγραφής των τελομερών (End Replication Problem)

Το μήκος του τελομερικού DNA ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα είδη (Zakian, 1995). Έχει δειχθεί ότι στους ανθρώπους και στα ποντίκια, το μήκος των τελομερικών επαναλήψεων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους διαφέρει και για τον λόγο αυτό οι κυτταρικές σειρές των οργανισμών αυτών παρουσιάζουν υποπληθυσμούς κυττάρων με διαφορετικά τελομερικά μήκη (Lansdorp et al., 1996, Londono-Vallejo et al., 2001, Baird et al., 2003, Bolzan & Bianchi, 2006).

Κατά τη βρεφική ηλικία τα τελομερή του ανθρώπου έχουν μήκος 15-20 κιλοβάσεις και μικραίνουν σταδιακά κατά την διάρκεια της ζωής (Shay & Wright, 2007). Συγκεκριμένα, τα τελομερή χάνουν περίπου 50 με 100 ζεύγη νουκλεοτιδίων ανά κυτταρική διαίρεση ρυθμίζοντας με αυτό το τρόπο το προσδόκιμο αριθμό διαιρέσεων των σωματικών κυττάρων (Zakian, 1995, Harley et al., 1990). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως στο πρόβλημα της αντιγραφής των γραμμικών άκρων DNA, καθώς κατά την αντιγραφή της μη συνεχούς νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, μέσω τμημάτων Okazaki, το 3' άκρο της πατρικής αλυσίδας παραμένει μονόκλωνο (Οιονίκιον, 1973, Watson, 1972).

Όλες οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν DNA με κατεύθυνση 5' προς 3', ενώ δεν μπορούν να ξεκινήσουν την αντιγραφή *de novo*. Για το λόγο αυτό, απαιτείται η ύπαρξη ενός RNA εκκινητή, μεγέθους 8-12 νουκλεοτιδίων. Κατά την αντιγραφή του συνεχούς-νεοσυντιθέμενου κλώνου (leading strand), οι DNA πολυμεράσες επιμηκύνουν τους RNA εκκινητές κατά συνεχόμενο τρόπο, μέχρις ότου φτάσουν στο τέλος του χρωμοσώματος δημιουργώντας ισοζυγισμένα άκρα (blunt ends) (Wellinger & Zakian, 2012). Αντίθετα, κατά την αντιγραφή του ασυνεχούς-νεοσυντιθέμενου κλώνου (lagging strand) κάθε τμήμα Okazaki ξεκινά με έναν RNA εκκινητή, με αποτέλεσμα το τελευταίο RNA τμήμα να απομακρύνεται χωρίς να μπορεί να αντικατασταθεί από τις DNA πολυμεράσες (Greider, 2016). Έτσι δημιουργείται μία προεξοχή του 3' άκρου.

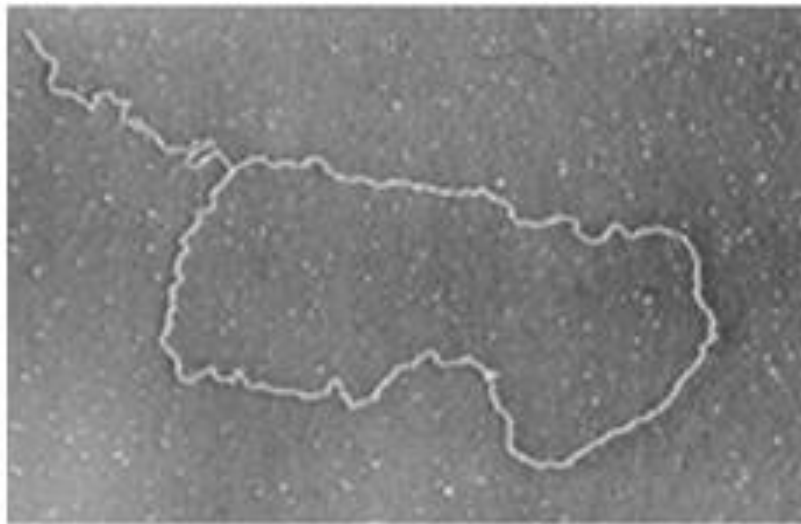
Μέσω της προοδευτικής μείωσης, το μήκος των τελομερών φτάνει σ' ένα κρίσιμο μέγεθος, στο οποίο ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA που οδηγούν το κύτταρο σε γήρανση και απόπτωση, με σκοπό την αποφυγή χρωμοσωμικών αναδιατάξεων και συντήξεων (Ennour-Idrissi et al., 2017). Το κρίσιμο αυτό μέγεθος,

ονομάζεται όριο Hayflick, και αποτελεί ένα πεπερασμένο αριθμό αντιγραφών που επιτρέπονται από το κύτταρο (Hayflick, 1965).

Η απώλεια όμως του τελομερικού μήκους μπορεί να οφείλεται και στην οξειδωτική βλάβη στο τελομερικό DNA (Kawanishi & Oikawa, 2004, von Zglinicki et al., 1995), στη δράση εξωνουκλεασών στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Makarov et al., 1997) ή στην απώλεια μηχανισμών νεοσύνθεσης του τελομερούς (Blasco et al., 1997).

A.1.3 Τελομερική θηλιά (t-loop)

Τα τελομερή δημιουργούν μία ιδιαίτερη διαμόρφωση στο χώρο, η οποία συμβάλλει στην προστασία τους. Πιο συγκεκριμένα, στον άνθρωπο τα τελομερή οργανώνονται σε δίκλωνη θηλιά(t-loop), η οποία δημιουργείται με την περιστροφή και παρείσφρηση του 3' μονόκλωνου άκρου στη δίκλωνη περιοχή του τελομερικού DNA (Griffith et al., 1999)μέσω χιάσματος τύπου Holliday (Holliday Junction) (de Lange, 2005)(Εικόνα 2).

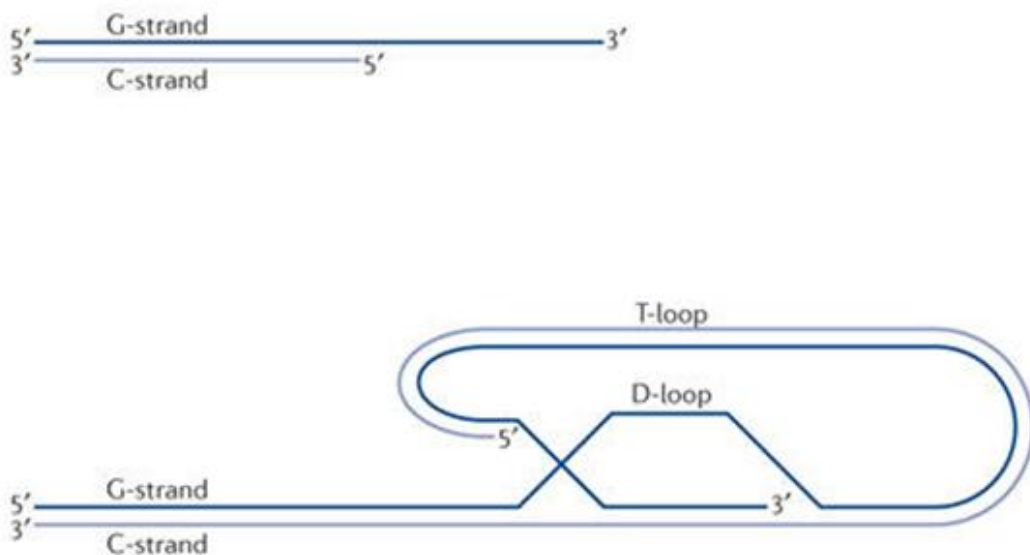


Εικόνα 2. Απεικόνιση T-θηλιάς τελομερικού DNA μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ύστερα από απομόνωσή του από HeLa κύτταρα (Griffith et al., 1999)

Η διαμόρφωση των τελομερών σε T-θηλιά προστατεύει τα άκρα των χρωμοσωμάτων από τη δράση εξωνουκλεασών και τελομερικών συντήξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνει τη μη αναγνώριση των τελομερών ως θραύσματα της διπλής έλικας (DSB, Double Strand Breaks) (de Lange, 2009). Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα αποφεύγουν την επιστράτευση μηχανισμών επιδιόρθωσης, η δράση των οποίων θα είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Longhese, 2008). Επιπλέον,

προσπάθειες επιδιόρθωσης θα οδηγούσαν σε δυσμενείς συνέπειες στη γενετική ακεραιότητα (de Lange, 2009).

Η παραπάνω δομή ανακαλύφθηκε μετά από ανάλυση απομονωμένου τελομερικού DNA από κύτταρα των οργανισμών *Mus musculus* και *Homo sapiens* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (de Lange, 2004). Πιο αναλυτικά, το 3' άκρο εκτοπίζει την πλούσια σε μόρια γουανίνης αλυσίδα (G-rich αλυσίδα) από τη διπλή έλικα του τελομερικού DNA σχηματίζοντας έτσι το βρόγχο εκτόπισης (Displacement loop - D-loop) (de Lange, 2004) (Εικόνα 3)



Εικόνα 3. Η δομή t-loop, προστατεύει τα τελομερή από τη δράση των DNA επιδιορθωτικών μηχανισμών (Nandakumar & Cech, 2013).

Η t-loop εμπλουτίζεται με μια σειρά πρωτεϊνών που δένονται στο μονόκλωνο άκρο του τελομερικού DNA. Το μέγεθος της ποικίλει και δε φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία των τελομερών. Φαίνεται ότι ο κύριος ρόλος της t-loop είναι η προστασία του μονόκλωνου 3' άκρου των τελομερών και ο έλεγχος της επιμήκυνσης (de Lange, 2004).

A.1.4 Πρωτεϊνικό σύμπλοκο Σελτερίνης (Shelterin Complex)

Τα μονόκλινα άκρα των τελομερών θα μπορούσαν να αναγνωριστούν από μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, ως σημεία θραύσης (de Lange, 2002). Για την αποφυγή αναγνώρισης, τα τελομερή προστατεύονται μέσω ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου έξι πρωτεϊνών. Το σύμπλοκο αυτό ονομάστηκε Σελτερίνη (Shelterin complex) από την

"κρύβοντας" με αυτό το τρόπο το εκτεθειμένο χρωμοσωμικό άκρο, ίσως αποτελεί και την εξήγηση του γιατί τα τελομερικά άκρα δεν αναγνωρίζονται από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς ως θραύσεις του DNA.

A.1.5 Τελομερική λειτουργία

Ο κύριος ρόλος των τελομερών έγκειται στο να διατηρούν την ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων, προστατεύοντας τα από αποικοδόμηση, ανασυνδυασμό ή σύντηξη, και το επιτυγχάνουν αυτό με το να παρεμποδίζουν τα άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων να αναγνωριστούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου ως δίκλινα ρήγματα DNA (DNA Double Strand Breaks, DSBs) (Blackburn, 2001, Cervantes & Lundblad, 2002, Chan & Blackburn, 2002, de Lange, 2002, Kaufmann, 1989, Mc Eachern et al., 2000).

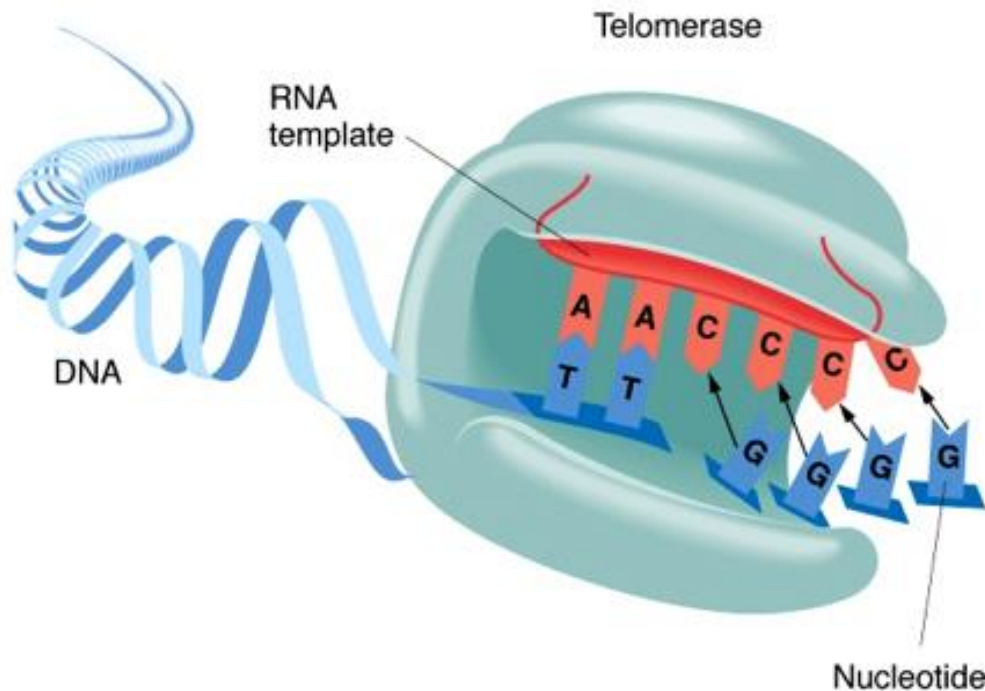
Τα τελομερή φαίνεται να λειτουργούν ως ρυθμιστές του «προσδόκιμου ζωής» των κυττάρων, καθορίζοντας τον αριθμό των αντιγραφών που μπορεί να υποστεί το DNA (Bolzan & Bianchi, 2006). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των τελομερών αφορά στη δυνατότητα τους να αποσιωπούν γονίδια που εδράζονται σε υποτελομεριδικές περιοχές. Το φαινόμενο ονομάζεται επίδραση της θέσης των τελομερών (telomere position effect) και φαίνεται να ρυθμίζεται από το μήκος των τελομερών, αλλά και τη δομή της ετεροχρωματίνης (Bolzan & Bianchi, 2006, Baur et al., 2001). Τέλος, τα τελομερή έχουν θεμελιώδεις ρόλους κατά τον διασκελισμό ομόλογων χρωμοσωμάτων στην πρώτη μειωτική πρόφαση, καθώς και στην διατήρηση της τοπολογίας των χρωμοσωμάτων στον κυτταρικό πυρήνα (Amrichova et al., 2003, de Lange, 1992, Greider, 1996).

A.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

A.2.1 Τελομεράση

Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη, με ενζυματική ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, που έχει την ικανότητα να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα RNA (Blackburn et al., 2006). Περιγράφεται για πρώτη φορά το 1985 από τις Greider και Blackburn, οι οποίες ανακοίνωσαν την ανακάλυψη ενός ενζύμου, στο βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila*, που επιμηκώνει τα τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Greider & Blackburn, 1985). Η ανθρώπινη τελομεράση συνίσταται από δύο κύριες υπομονάδες, μία RNA υπομονάδα (human Telomerase RNA Component - hTERC) (Feng et al., 1995) που λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση τελομερικού DNA και μία

καταλυτική υπομονάδα (human Telomerase Reverse Transcriptase -hTERT) με δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (Lingner et al., 1997, Harrington et al., 1997). Πιο συγκεκριμένα, η τελομεράση επιμηκύνει τη μονόκλωνη 3' προεξοχή (G-rich αλυσίδα) κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ κατά το τέλος της S φάσης, ένα τμήμα της μετατρέπεται σε δίκλωνο με τη δράση των DNA πολυμερασών α και δ (Verdijn & Karlseder, 2007) (Εικόνα 5).



Εικόνα 2. Δομή και λειτουργία της τελομεράσης. (<http://www.martinfrost.ws/htmlfiles/sept2008/cancer-telomerase.html>)

Στα περισσότερα φυσιολογικά, σωματικά κύτταρα φαίνεται πως η τελομεράση δεν είναι ενεργοποιημένη, ενώ ενεργοποιείται στο 85-90% των καρκίνων δημιουργώντας ένα θετικό ισοζύγιο στη διακύμανση του μήκους των τελομερών οδηγώντας στη αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης και απόπτωσης (Kim et al, 1994, Shay & Bacchetti, 1997). Στους ανθρώπους η τελομεράση εκφράζεται κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης και έπειτα καταστέλλεται. Απουσιάζει από την πλειονότητα των φυσιολογικών ανθρώπινων σωματικών κυττάρων με εξαίρεση την αρσενική γαμετική σειρά, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές και τα βλαστοκύτταρα (Bolzan & Bianchi, 2006, Harle-Bachor & Boukamp, 1996, Hines et al., 2005, Kolquist et al., 1998).

A.2.2.1 Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (ALT)

Ένα ποσοστό κακοηθειών της τάξεως του 10-15%, που δεν παρουσιάζουν ενεργότητα της τελομεράσης, καταφέρνουν να διατηρούν το μήκος των τελομερών τους μέσω του Εναλλακτικού Μηχανισμού Επιμήκυνσης Τελομερών – Alternative lengthening of Telomeres, ALT (Bryan & Reddel, 1997).

Οι ανθρώπινοι καρκίνοι που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό για την επιμήκυνση των τελομερών τους, εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, τα οποία συνάδουν με την υπόθεση πως ο ALT μηχανισμός βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR) (Dunham et al., 2000, Conomos et al., 2013). Στα χαρακτηριστικά αυτά συμπεριλαμβάνονται η ετερογένεια στο μήκος των τελομερών (Bryan et al., 1995, Bryan et al., 1997), το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από <2kb έως >50 kb (Henson et al., 2002, Cesare & Reddel, 2008). Η αύξηση και η μείωση του μήκους των τελομερών με μεγάλη ταχύτητα (Murnane et al., 1994), καθώς και η ύπαρξη γραμμικού και κυκλικού εξωχρωμοσωμικού τελομερικού DNA (Henson et al., 2009, Cesare & Griffith, 2004). Το κυκλικό, εξωχρωμοσωμικό, τελομερικό DNA μπορεί να είναι δίκλωνο: t-circles ή μερικώς δίκλωνο: C-circles και G-circles, ανάλογα με την τελομερική αλληλουχία που είναι πλήρης (Cesare & Reddel, 2010). Ωστόσο, μόνο τα C-circles φαίνεται να αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό του ALT μηχανισμού. Επιπλέον, στα χαρακτηριστικά του ALT μηχανισμού συμπεριλαμβάνονται τα υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας (Sakellariou et al., 2013), η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης φαινομένων ανασυνδυασμού μεταξύ των τελομερών των αδελφών χρωματίδων (Telomere-sister chromatid exchange, T-SCE) (Londono-Vallejo et al., 2004), καθώς και η παρουσία σφαιρικών πυρηνικών δομών, πλούσιων σε πρωτεΐνη PML (promyelocytic leukemia, PML), που ονομάζονται APBs (ALT-associated PML bodies, APBs) (Yeager et al., 1999). Τα σωματίδια αυτά, περιέχουν τελομερικό DNA, πρωτεΐνες του συμπλόκου της σελετερίνης και παράγοντες που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, όπως το σύμπλοκο MRN (Mre11–Rad50–Nbs1) (Henson et al., 2002). Τα τελομερή των χρωμοσωμάτων φαίνεται να δεσμεύονται και να αποδεσμεύονται από τα APBs με δυναμικό τρόπο, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεχή επιμήκυνση τους (Molenaar et al., 2003). Τέλος, ο αριθμός των APBs αυξάνεται κατά την G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ενεργοποιημένος (Grobely et al., 2000).

Παρόλο που ο ακριβής ALT μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, είναι κοινώς αποδεκτό πως περιλαμβάνει ένα στάδιο ανασυνδυασμού του τελομερικού DNA. Προτεινόμενο μοντέλο αποτελεί η, εξαρτώμενη από τον ομόλογο ανασυνδυασμό, αντιγραφή του DNA (Cesare & Reddel, 2010), σύμφωνα με την οποία η νέα τελομερική αλληλουχία συντίθεται χρησιμοποιώντας ως μήτρα ήδη υπάρχουσα, γειτονική, τελομερική αλληλουχία, όχι όμως απαραίτητα χρωμοσωμική.

A.2.2.2 Ο ALT μηχανισμός στα φυσιολογικά κύτταρα

Έρευνες έδειξαν ότι στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, πιο συγκεκριμένα στο προεμφυτευτικό στάδιο, από το ζυγωτό έως τη βλαστοκύστη, ο μεταβολισμός των τελομερών των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων πιθανώς ρυθμίζεται αποκλειστικά από τον ALT μηχανισμό. Μετά το στάδιο της βλαστοκύστης στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα συνυπάρχουν ο ALT μηχανισμός και η τελομεράση (Liu et al, 2007). Στα σωματικά κύτταρα ο ALT μηχανισμός έχει ανιχνευθεί, πέρα από τα καρκινικά και σε φυσιολογικά κύτταρα. Έρευνες που έγιναν σε ποντίκια απέδειξαν ότι ο ALT μηχανισμός ενεργοποιείται σε σωματικούς ιστούς με εξαίρεση τα κύτταρα της γαμετικής σειράς (Neumann et al., 2013). Πειράματα σε ανθρώπινους ιστούς έδειξαν την ενεργοποίηση του ALT σε σωματικά, ενδοθηλιακά και επιδερμικά κύτταρα (Slatter et al., 2012). Επομένως, μπορούμε να πούμε ότι ο ALT μηχανισμός είναι μια φυσιολογική διαδικασία της οποίας η απορρύθμιση δημιουργεί ένα γόνιμο περιβάλλον για καρκινογένεση.

A.2.3 Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία είναι αλληλουχίες DNA με την ιδιότητα να μετακινούνται από μία θέση σε άλλη ή από ένα μόριο DNA σε άλλο (Mc Clintock, 1950). Η παρουσία των μεταθετών στοιχείων είναι παγκόσμια και αποτελούν σημαντικό συστατικό όλων των γονιδίων.

Τα μεταθετά στοιχεία ή αλλιώς τρανσποζόνια, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους, τα ρετροτρανσποζόνια και τα DNA τρανσποζόνια (Pray, 2008). Η διαφορά τους έγκειται στο ότι τα ρετροτρανσποζόνια χρησιμοποιούν ένα RNA ενδιάμεσο πριν την εισχώρησή τους σε άλλη θέση (Madigan & Marttinko, 2006).

Μετά από μελέτες στη *Drosophila Melanogaster* και τον τρόπο επιμήκυνσης των τελομερών της, αποδείχτηκε πως η διατήρηση του μήκους των τελομερών επιτυγχάνεται

όχι μέσω της δράσης της τελομεράσης, αλλά μέσω ενός μοναδικού μηχανισμού τρασποζονίων. Δύο ρετροτρασποζόνια, τα HeT-A και TART (Telomere Associated Retro Transposons) συνδέονται ειδικά στα χρωμοσωμικά άκρα των τελομερών της *Drosophila* αποκαλύπτοντας νέες προοπτικές πάνω στο θέμα της επιμήκυνσης των τελομερών (Louis, 2002).

A.3 ΣΧΕΣΗ ΤΕΛΟΜΕΡΙΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

A.3.1 Χαρακτηριστικά νεοπλασιών

Τα νεοπλασματικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από γενωμικές αλλαγές που οδηγούν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή/και απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Gorgoulis et al., 2005). Οι αλλαγές αυτές συσσωρεύονται καθώς εξελίσσεται ο καρκίνος και μπορούν να εντοπιστούν ως μετατοπίσεις, ελλείψεις ή διπλασιασμοί χρωμοσωμικού DNA. Ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό των νεοπλασιών είναι η απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Το χαρακτηριστικό αυτό βασίζεται, στην ενεργοποίηση μηχανισμών επιμήκυνσης των τελομερών κατά την έξοδό τους από την κυτταρική γήρανση (senescence) και την κρίση που δημιουργείται από εκτεταμένη τελομερική δυσλειτουργία (Hanahan & Weinberg, 2011).

Στην πλειοψηφία των νεοπλασιών, παρατηρείται ενεργοποίηση του ενζύμου τελομεράση, ενώ ένα μικρό ποσοστό καρκινικών τύπων επιμηκύνει τα τελομερή του μέσω εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) (Muntoni & Reddel, 2005).

A.3.2 Χρωμοσωμική αστάθεια

Η γενωμική αστάθεια στη νεοπλασία χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες και παραλλαγές του γενετικού υλικού και διακρίνεται σε κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος της γενετικής ανωμαλίας. Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN-Chromosomal Instability in Neoplasia) είναι η πιο διαδεδομένη μορφή γενωμικής αστάθειας στη νεοπλασία και οδηγεί σε αλλαγές στη δομή αλλά και στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (Rajagopalan et al., 2004). Αποτελεί ίδιον των νεοπλασιών καθώς το 90% των συμπαγών όγκων αλλά και πολλές αιματολογικές κακοήθειες φέρουν CIN (Weaver & Cleveland, 2006). Η CIN είναι συνεχής διαδικασία, διότι κατά την εξέλιξη της νόσου, ενισχύεται διαρκώς από τη έκθεση των πολλαπλασιαζόμενων νεοπλασματικών κυττάρων σε τελομερική δυσλειτουργία (Bailey & Murnane, 2006), στρες

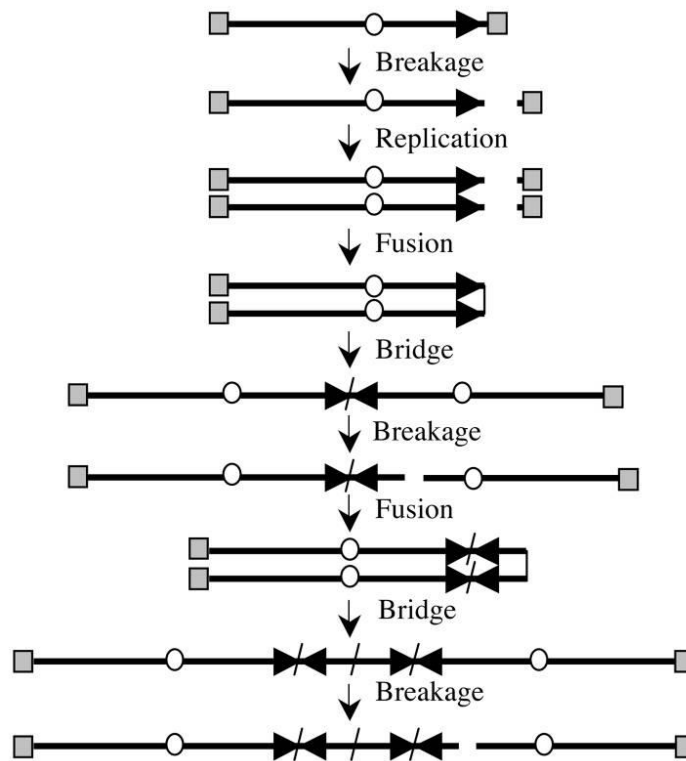
αντιγραφής (Burrell et al., 2013), ανεπάρκεια των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Cahill et al., 1998) και διαταραχές της μιτωτικής ατράκτου (Neil et al., 2009).

Η χρωμοσωμική αστάθεια δημιουργεί κλωνικές ογκογόνες μεταλλάξεις, οι οποίες συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στην γενωμική ετερογένεια στον καρκίνο, και είναι υπεύθυνες για την εξέλιξή του (Gagos & Irminger-Finger, 2005). Επιπλέον η CIN σχετίζεται με προχωρημένες και ανίατες μορφές κακοήθειας, καθιστώντας περίπλοκη την οποιαδήποτε θεραπευτική στρατηγική (Roschke & Kirsch, 2010)

A.3.3 Το αυτοτροφοδοτούμενο φαινόμενο «breakage-fusion-bridgecycle»

Κατά την κυτταρική κρίση, η γενωμική αστάθεια και η τελομερική δυσλειτουργία συνδέονται μέσω του κλασικού μηχανισμού breakage-fusion-bridge cycle (B/F/Bcycle), που περιγράφεται για πρώτη φορά από την Barbara Mc Clintock (Mc Clintock, 1941). Σε αυτή την αλυσίδα των γεγονότων, τα μη προστατευμένα ή σπασμένα τελομερή μπορούν να συγχωνευθούν σε άλλο χρωμοσωμικό άκρο μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού (Non-homologous End Joining, NHEJ). Οι συντήξεις δημιουργούν δικεντρικά χρωμοσώματα που τελικά σπάνε σε τυχαίες θέσεις κατά τη διάρκεια της μίτωσης, δημιουργώντας ελλείμματα και διπλασιασμούς χρωμοσωμικών τμημάτων και περισσότερα μη προστατευμένα άκρα χρωμοσωμάτων (Murnane, 2012)(Εικόνα 6).

Αυτός ο κύκλος παραμένει μέχρις ότου τα χρωμοσωμικά άκρα σταθεροποιηθούν με προσθήκη τελομερών μέσω ενεργοποίησης τελομεράσης ή κάποιου φαινομένου μετατόπισης. Στον άνθρωπο, η τελομεράση ενεργοποιείται στην πλειονότητα των καρκίνων, σε ποσοστό 85-90% (Kim et al., 1994; Lingner et al., 1997). Ωστόσο, σε ένα υποσύνολο όγκων (10% με 15%), κυρίως μεσεγχυματικής προέλευσης (π.χ. σαρκώματα), τα τελομερή διατηρούνται μέσω του εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) (Muntoni & Reddel, 2005).



Εικόνα 6. Το αυτοτροφοδοτούμενο φαινόμενο «breakage-fusion-bridgecycle». Τα γκρι τετράγωνα αναπαριστούν τα τελομερή, οι κύκλοι τα κεντρομερίδια και τα οριζόντια βελάκια την κατεύθυνση των υποτελομεριδιακών περιοχών (Murnane, 2012).

A.3.4 Πλεονεκτήματα κυττάρων που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό

Η εξέλιξη του καρκινικού γονιδιώματος στους ανθρώπους, θεωρείται μία αργή διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει αρκετά χρόνια για να παραχθεί ένα πολύ κακόηθες γονιδίωμα (Sakellariou et al, 2013). Αυτό δε συμβαίνει στην περίπτωση των καρκινικών όγκων που χρησιμοποιούν τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών (ALT).

Η κυτταρική αθανатоποίηση και συνεχής ανάπτυξη μέσω του ALT μηχανισμού, συνοδεύεται από εξαιρετικά υψηλά ποσοστά CIN που παράγουν μια πληθώρα τυχαίων και κλωνικών δομικών χρωσωμικών ανωμαλιών, και πολύ συχνών αριθμητικών χρωσωμικών μεταλλαγών (Scheel et al., 2001). Τα υψηλά επίπεδα τελομερικής δυσλειτουργίας, που χαρακτηρίζουν τα ALT κύτταρα, επάγουν την πολυπλοειδία και την εκτεταμένη απώλεια ή κέρδος χρωσωμάτων (Christodoulidou et al., 2013), καθιστώντας τον ALT καρυότυπο ένα ιδανικό πλαίσιο για τη μελέτη των μαζικών μεταβολών του γονιδιώματος του όγκου.

Εν κατακλείδι θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι ο ALT μηχανισμός, μέσω της υψηλής τελομερικής δυσλειτουργίας και αυξημένης χρωμοσωμικής αστάθειας, σε σχέση με τα κύτταρα που φέρουν ενεργή τελομεράση (Sakellariou et al, 2013), συντηρεί την γενετική ετερογένεια μέσα σε έναν όγκο και προάγει την ταχύτερη εξέλιξή του. Σε συνδυασμό με το γεγονός πως ο εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης, είναι ένας τομέας ανεξερεύνητος, αποτελεί την πρώτη επιλογή για την διερεύνηση κακοηθειών.

A.3.5.1 Ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς NR2C/F

Το πρώτο βήμα προς την κατανόηση της σχέσης της τελομερικής δυσλειτουργίας και χρωμοσωμικής αστάθειας σε κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, έγινε μέσω της μελέτης των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων NR2C/F.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors) είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την ανίχνευση στεροειδών και θυροειδών ορμονών και κάποιων άλλων μορίων. Επιπλέον, οι πυρηνικοί υποδοχείς λειτουργούν με άλλες πρωτεΐνες για να ρυθμίσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ελέγχοντας έτσι την ανάπτυξη, ομοιοστάση, και το μεταβολισμό του οργανισμού (Evans, 1988).

Μία μοναδική ιδιότητα των πυρηνικών υποδοχέων που τα διαφοροποιεί από άλλες κατηγορίες υποδοχέων είναι η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν και να ελέγχουν άμεσα την έκφραση του γενωμικού DNA (γονιδιώματος). Κατά συνέπεια, οι πυρηνικοί υποδοχείς διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στην εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και στην ομοιοστάση ενηλίκων (Laudet, 1997).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν την ικανότητα να προσδένονται άμεσα με το DNA και να ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών γονιδίων, και γι' αυτό αυτοί ταξινομούνται στους παράγοντες μεταγραφής. Η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου από πυρηνικούς υποδοχείς γενικά συμβαίνει μόνο υπό την παρουσία ενός συνδέτη (ligand)-μόριο που επηρεάζει τη συμπεριφορά του υποδοχέα-. Πιο συγκεκριμένα, ο συνδέτης συνδέεται με ένα πυρηνικό υποδοχέα διαμορφώνοντάς τον. Αυτό ενεργοποιεί τον υποδοχέα και οδηγεί στην αύξηση ή την μείωση της γονιδιακής έκφρασης (Olefski, 2001). Όταν ο συνδέτης δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός, μιλάμε για ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς.

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες πυρηνικών υποδοχέων ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους. Οι NR2C/F που μελετάμε ανήκουν στον Τύπο I-υποοικογένεια 2 και ανήκουν είτε στην ομάδα C, είτε στην F. Στον Τύπο I απουσιάζει ο συνδέτης και ο πυρηνικός υποδοχέας βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η ορμόνη που συνδέεται στον πυρηνικό υποδοχέα ενεργοποιεί τη διάσπαση των πρωτεϊνών, το διμερισμό και τη μεταφορά του πυρηνικού υποδοχέα στον πυρήνα, όπου συνδέεται με ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA γνωστό ως στοιχείο ανταπόκρισης ορμόνης hormone response elements -HREs. Το σύμπλεγμα πυρηνικού υποδοχέα/ DNA συγκεντρώνει άλλες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφή του DNA σε mRNA (με κατεύθυνση 5'→3'). Το mRNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, η οποία ενδεχομένως να προκαλέσει αλλαγές στη λειτουργία του κυττάρου (Mangelsdorf et al., 1995, Novac & Heinzl, 2004).

A.3.5.2 Οι NR2C/F στον ALT μηχανισμό

Οι πρωτεΐνες του συμπλόκου σελητερίνης και οι ιστόνες, είναι οι πρωτεΐνες που περιμέναμε να έχουν την μεγαλύτερη συσχέτιση με τελομερή καθώς διαδραματίζουν δομικό ρόλο στη θέση αυτή. Παρόλα αυτά στα τελομερή, μόνο των ALT κυττάρων, βρέθηκε και η παρουσία ορφανών υποδοχέων. Οι δύο επικρατέστεροι ήταν ο COUP-TF2 (NR2F2) και ο TR4 (NR2C2), οι οποίοι εμφανίζονταν σε ποσοστό μεγαλύτερο και από τις πρωτεΐνες POT1 και TPP1 του συμπλόκου σελητερίνης (Déjardin & Kingston, 2009).

Μελέτες που ακολούθησαν απέδειξαν πως οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδέονται στην τελομερική αλληλουχία 5'-GGGTCA-3', αντί της κανονικής 5'-GGGTTA-3' Η διαφορετική αυτή αλληλουχία, είναι σπάνια σε φυσιολογικά τελομερή, συσσωρεύεται όμως στην περίπτωση των ALT τελομερών (Conomos et al., 2012).

Μέρος της αποσαφήνισης του ρόλου των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων και της διερεύνησης του εάν είναι αντίκτυπο του ALT μηχανισμού ή αν τον επάγουν, διεξάχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

A.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΔΙΚΛΩΝΟΥ DNA

Το γονιδίωμα υφίσταται συνεχώς φθορές, γεγονός που είναι αναπόφευκτο αφού αποτελεί φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Οι βλάβες αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: 1) τις ενδογενείς, που προκαλούνται κατά τη διάρκεια κυτταρικών διαδικασιών όπως η αντιγραφή του DNA και οι ενεργές μορφές οξυγόνου (Negritto, 2010). και 2) τις

εξωγενείς, που προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες όπως η έκθεση σε ακτινοβολία UV, η θερμική διάσπαση ουσιών, η τοξίνες, το κάπνισμα, και τα χημικά μεταλλαξογόνα (Hoeijmakers, 2001).

Η πρόκληση θραύσεων της διπλής έλικας του DNA (Double-Strand Breaks, DSB) στα χρωμοσώματα είναι ένα από τα αποτελέσματα της δράσης των επιβλαβών παραγόντων στα κύτταρα. Τα DSB είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα για το κύτταρο επειδή μπορούν να οδηγήσουν σε αναδιατάξεις γονιδιώματος. Ωστόσο, DSB μπορούν να προκληθούν και από φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων, ο ανασυνδυασμός κατά τη μείωση ή ο «ανταγωνισμός» μεταξύ αντιγραφής και μεταγραφής του DNA (Aguilera & Gaillard, 2014, Mehta & Haber, 2014, Syeda et al., 2014). Ανεξάρτητα από τον τρόπο με τον οποίο δημιουργούνται, η επιδιόρθωση τους είναι αναγκαία για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Αδυναμία επιδιόρθωσής τους μπορεί να επιφέρει δυσμενείς συνέπειες, όπως απώλεια γενετικής πληροφορίας, χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, ακόμα και κυτταρικό θάνατο (Bhattacharjee & Nandi, 2016).

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των DSBs χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, αναλόγως με το αν απαιτείται ομόλογη αλληλουχία για την επιδιόρθωση. Ο μη-ομόλογος ανασυνδυασμός των άκρων των χρωμοσωμάτων (non-homologous end joining-NHEJ), όπως υποδηλώνει και η ονομασία του, δεν εξαρτάται εξολοκλήρου από την ομολογία της αλληλουχίας και είναι ο βασικός μηχανισμός επιδιόρθωσης κατά τις G0 και G1 φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Chiruvella et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, ο ομόλογος ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μέσω της ανταλλαγής πανομοιότυπων ή μερικώς όμοιων αλληλουχιών, με αποτέλεσμα την επίδραση ή μη στη γενετική πληροφορία (San Filippo et al., 2008). Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ο κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA κατά τις S και G2 φάσεις του κυτταρικού κύκλου, όπου και πραγματοποιείται η αντιγραφή (San Filippo et al., 2008, Bhattacharjee & Nandi, 2016).

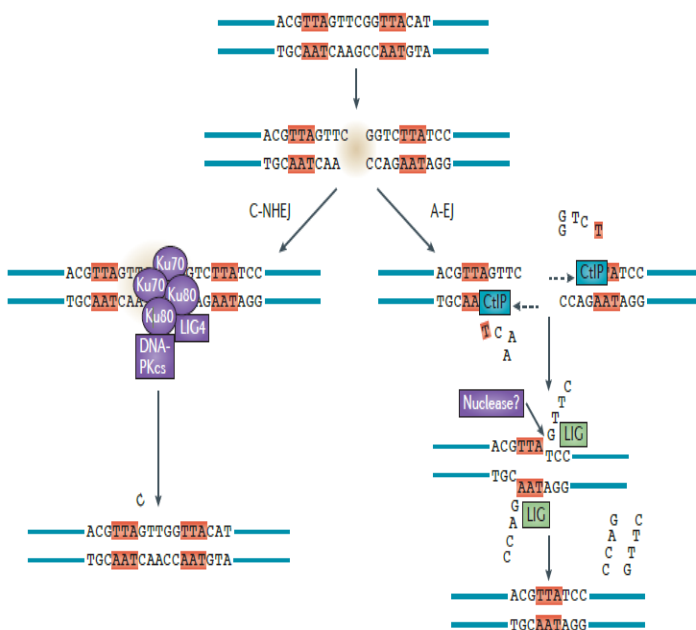
A.4.1 Μη-ομόλογος ανασυνδυασμός (Non-homologous End Joining, NHEJ)

Ως μη-ομόλογος ανασυνδυασμός (NHEJ) ορίζεται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης κατά τον οποίο, δύο DSBs ενώνονται με απευθείας ευθυγράμμιση των αλυσίδων τους, δημιουργώντας περιοχές σύνδεσης με καθόλου ή ελάχιστη ομολογία (λιγότερο από 10 bp). Ο όρος "non-homologous end joining" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996 από τους

Moore και Haber (Moore & Haber,1996). Συνήθως, αναφέρεται ως κανονική μορφή του NHEJ (canonical NHEJ, c-NHEJ) και εξαρτάται από τη δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (Chiruvella et al., 2013)(Εικόνα 7). Παρ' όλα αυτά, είναι πολύ πιθανό, εν μέσω της διαδικασίας να δημιουργηθούν μικρές αφαιρέσεις ή προσθήκες νουκλεοτιδίων (Daley et al., 2005, Ma et al., 2005). Για το λόγο αυτό, η διαδικασία θεωρείται πως επιτρέπει τη δημιουργία λαθών στην αλληλουχία του DNA.

Στην περίπτωση που ο c-NHEJ μηχανισμός είναι απενεργοποιημένος, τα DSBs επιδιορθώνονται μέσω ενός εναλλακτικού μηχανισμού EJ (alternative EJ, a-EJ), επίσης γνωστό ως μεσολαβούμενος από μικρο-ομολογία EJ (Microhomology-mediated end joining, MMEJ) (Bhattacharjee & Nandi, 2016). Ο alt-EJ μηχανισμός παρουσιάζει αρκετά διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά από τον c-NHEJ. Ένα από αυτά είναι και η χρήση μικρής, ομόλογης, νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, μήκους 5-25 bp, κατά την ευθυγράμμιση των δύο θραυσματοποιημένων μορίων, πριν την επιμήκυνση τους (Bhattacharjee & Nandi, 2016). Επιπλέον, δεν απαιτεί τη ύπαρξη των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, ενώ σε αντίθεση με την κανονικό μηχανισμό NHEJ, που πραγματοποιείται αρκετά γρήγορα, ο εναλλακτικός μηχανισμός NHEJ πραγματοποιείται σχετικά αργά (Difilippantonio et al., 2000)(Εικόνα 7).

Η επανασύνδεση των χρωμοσωμικών άκρων μέσω του μη ομόλογου ανασυνδυασμού



οδηγεί σε απώλεια νουκλεοτιδίων, ιδίως στις περιπτώσεις όπου τα άκρα είναι ασύμβατα. Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας επανασύνδεσης μπορεί να οδηγήσει σε μεταποπίσεις και τελομερικές συντήξεις, που αποτελούν χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (Espejel et al.,2002).

Εικόνα 3. Στάδια κανονικού και εναλλακτικού NHEJ (Bunting & Nussenzweig,2013)

A.4.2 Ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous recombination, HR)

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ένας μηχανισμός γενετικού ανασυνδυασμού που χρησιμοποιείται κυρίως από τα κύτταρα για την επιδιόρθωση των επικίνδυνων θραύσεων της διπλής έλικας του DNA, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο κατά την μίτωση, καθώς οι νέοι ανασυνδυασμοί που προκύπτουν οδηγούν σε γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των απογόνων. Οι νέοι αυτοί ανασυνδυασμοί του DNA μπορούν με τη σειρά τους να επιτρέψουν σε κυτταρικούς πληθυσμούς την προσαρμογή στο συνεχώς εξελισσόμενο περιβάλλον (Alberts et al., 2002).

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι μηχανισμός επιδιόρθωσης που δεν επιτρέπει την δημιουργία λαθών, αφού το κύτταρο χρησιμοποιεί ομόλογο DNA ως μήτρα για την επιδιόρθωση των θραυσματοποιημένων άκρων (San Filippo et al., 2008). Ως ομόλογο DNA μπορεί να θεωρηθεί η αδελφή χρωματίδα, το ομόλογο χρωμόσωμα ή εξωχρωμοσωμική αλληλουχία (Bhattacharjee & Nandi, 2016). Μηχανιστικά, κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό, το DSB υφίσταται ενζυμική κατεργασία με σκοπό τη δημιουργία μονόκλωνης, 3' προεξοχής (Paull & Gellert, 1998). Το μονόκλωνο DNA καλύπτεται από την πρωτεΐνη αντιγραφής A (Replication Protein A, RPA), μέσω της οποίας προστατεύεται από τη δράση νουκλεασών, ενώ ταυτόχρονα η σύνδεση αυτή προάγει τον ανασυνδυασμό (San Filippo et al., 2008). Με τη βοήθεια πρωτεϊνών όπως η Rad52, Rad55-57 και άλλες, η RPA αντικαθίσταται από την Rad51 που προσδένεται στο μονόκλωνο άκρο σχηματίζοντας νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (Sugiyama & Kowalczykowski, 2002). Το σύμπλοκο αυτό, καταλύει την εισχώρηση της μονόκλωνης προεξοχής στο εσωτερικό της διπλής έλικας ομόλογης αλληλουχίας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θηλιάς (Displacement loop, D-loop). Στη συνέχεια, η 3' προεξοχή λειτουργεί ως εκκινήτης για τη σύνθεση DNA (San Filippo et al., 2008). Τέλος, η περαιτέρω επεξεργασία της θηλιάς και τα παραγόμενα προϊόντα ανασυνδυασμού εξαρτώνται από τη φύση του DSB και το γενετικό περιβάλλον (Hunter & Kleckner, 2001).

Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά μοντέλα επιδιόρθωσης που χρησιμοποιούν τον ομόλογο ανασυνδυασμό και είναι τα εξής: (1) DSB μονοπάτι επιδιόρθωσης (DSB repair pathway, DSBR), (2) ανασύνδεση κλώνου που εξαρτάται από σύνθεση DNA (Synthesis-dependent Strand Annealing, SDSA), (3) ανασύνδεση μονού κλώνου (Single Strand Annealing, SSA), (4) αντιγραφή επαγόμενη από θραύσεις δίκλωνου DNA (Break-induced Replication, BIR) (Bhattacharjee & Nandi, 2016).

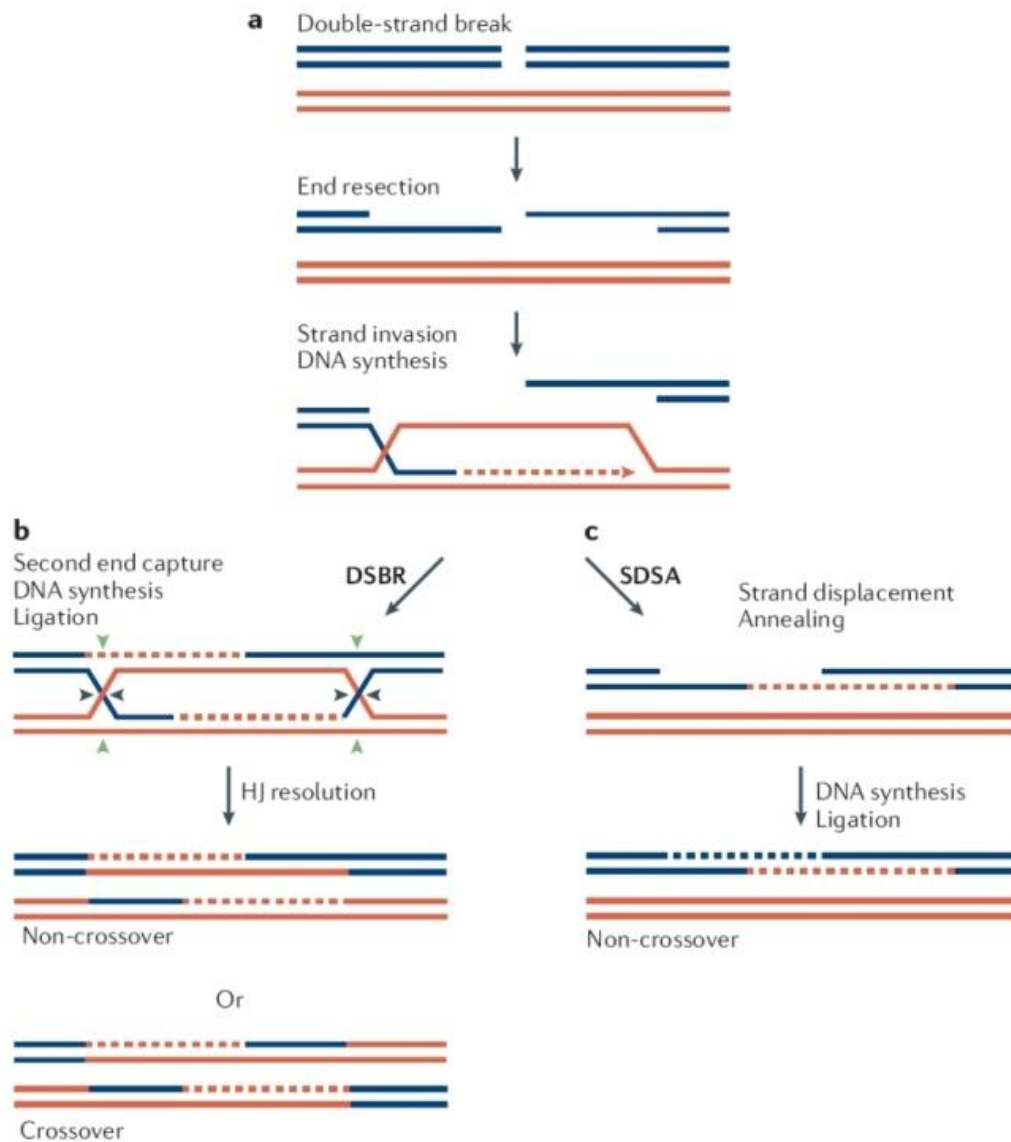
A.4.2.1 DSB μονοπάτι επιδιόρθωσης (DSB repair pathway, DSBR) και Ανασύνδεση κλώνου που εξαρτάται από σύνθεση DNA (Synthesis-dependent Strand Annealing, SDSA)

Τα βασικότερα μοντέλα που χρησιμοποιούν τον ομόλογο ανασυνδυασμό είναι το DSB μονοπάτι επιδιόρθωσης και η ανασύνδεση κλώνου που εξαρτάται από σύνθεση DNA. Και στα δύο μονοπάτια τα πρώτα διακριτά βήματα είναι πανομοιότυπα.

Η διαδικασία της επιδιόρθωσης ξεκινά με τη δημιουργία της 3' μονόκλωνης προεξοχής σε κάθε πλευρά του DSB. Η μία από αυτές εισχωρεί σε ομόλογη, δίκλωνη αλυσίδα DNA, δημιουργώντας θηλιά (D-loop) και χρησιμοποιείται ως εκκινήτης για τη σύνθεση νέου DNA με μήτρα την δίκλωνη αλυσίδα (Symington et al., 2014)(Εικόνα 8a). Μετά το στάδιο της εισχώρησης και της έναρξης της σύνθεσης του DNA, το κάθε μονοπάτι ακολουθεί τα δικά του ξεχωριστά βήματα.

Στο DSBR μονοπάτι η 3' προεξοχή της άλλης πλευράς του DSB συνδέεται στον εκτοπισμένο κλώνο της δίκλωνης αλυσίδας και λειτουργεί επίσης, ως εκκινήτης αντιγραφής του δεύτερου συνεχούς κλώνου. Με τη σύνδεση των 5' άκρων των δύο αλυσίδων, δημιουργούνται ενδιάμεσα χιάσματα τύπου Holliday (Holliday junction, HJ)(Symington et al., 2014). Για να διαχωριστούν τα δίκλινα προϊόντα του ανασυνδυασμού, πρέπει να απομακρυνθεί το HJ, γεγονός που μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της δράσης ελικασών και τοποϊσομερασών (dissolution), με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων χωρίς επιχιασμό (non-crossover, NCO) είτε μέσω της δράσης ενδονουκλεασών (resolution). Στην δεύτερη περίπτωση, κατά την τομή των εσωτερικών κλώνων και των δύο HJ, προκύπτει προϊόν χωρίς επιχιασμό (non-crossover, NCO), ενώ κατά την τομή των εσωτερικών κλώνων του ενός HJ και των εξωτερικών κλώνων του δεύτερου HJ, προκύπτει προϊόν με επιχιασμό (crossover, CO) (Bhattacharjee & Nandi, 2016, Symington et al., 2014) (Εικόνα 8b).

Εναλλακτικά, στην περίπτωση του SDSA, δε δημιουργείται χίασμα τύπου Holliday, αλλά μικρή θηλιά (D-loop), η οποία χωρίζεται μόλις ολοκληρωθεί η σύνθεση του νέου κλώνου, με τη βοήθεια ελικασών (Symington et al., 2014). Στη συνέχεια, ο νεοσυντιθέμενος κλώνος ευθυγραμμίζεται με το υπόλοιπο τμήμα του DSB, δημιουργώντας αποκλειστικά, προϊόν ανασυνδυασμού χωρίς επιχιασμό (non-crossover, NCO)(Nassif et al., 1994, Sun et al., 2008)(Εικόνα 8c).



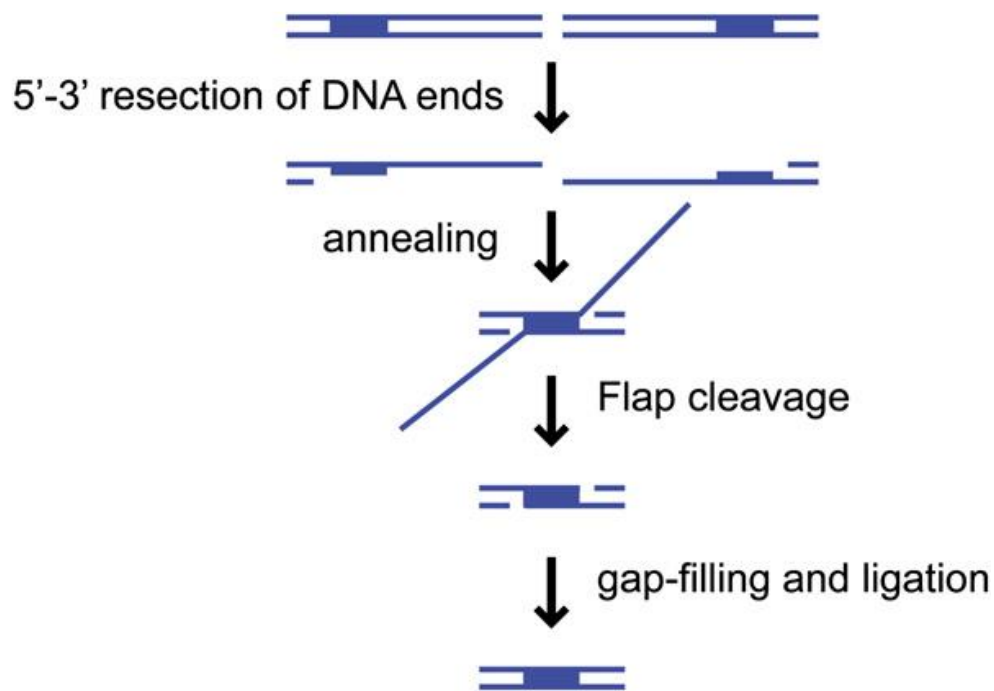
Εικόνα 4. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DSBR και SDSA α) Τα πρώτα κοινά βήματα που ακολουθούν το DSB β) ο DSBR μηχανισμός και τα προϊόντα του. Στην περίπτωση του μη επιχιασμού η λύση των HJ γίνεται στο σημείο που δείχνουν τα μαύρα βελιάκια, ενώ επιχιασμοί συμβαίνουν όταν το ένα HJ αποδεσμεύεται σύμφωνα με τα μαύρα βελιάκια και το άλλο σύμφωνα με τα πράσινα. γ) ο SDSA μηχανισμός (Sung & Klein, 2006)

A.4.2.2 Ανασύνδεση μονού κλώνου (Single Strand Annealing, SSA)

Ο μηχανισμός ανασύνδεσης μονού κλώνου έχει μελετηθεί επαρκώς στο πλαίσιο της επιδιόρθωσης των DSBs που δημιουργούνται σε περιοχές επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και αποτελεί ένα μεταλλαξογόνο μονοπάτι (Pâques & Haber, 1999).

Ο SSA μηχανισμός επιδιορθώνει επιτυχώς τα DSBs που δημιουργούνται μεταξύ επαναλήψεων >200 bp, ενώ η συχνότητα του μειώνεται σημαντικά σε επαναλήψεις μεγέθους <50 bp (Sugawara et al. 2000). Μετά την επεξεργασία των 5' άκρων των DSBs, οι

3' προεξοχές ευθυγραμμίζονται μεταξύ τους, με την προϋπόθεση ότι έχουν αφαιρεθεί τόσα νουκλεοτίδια ώστε να έχουν αποκαλυφθεί οι ομόλογες, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες και συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας δίκλινη περιοχή (Bhattacharjee & Nandi, 2016). Ταυτόχρονα οι μη ομόλογες αλληλουχίες εκτείνονται προς την εξωτερική περιοχή και εν συνεχεία αποκόπτονται μέσω της δράσης του συμπλόκου Rad1-Rad10 πριν την έναρξη της επανασύνδεσης (Pâques & Haber, 1999). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή κάποιων επαναλαμβανόμενων περιοχών (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Μηχανισμός επιδιόρθωσης SSA (Symington et al., 2014)

Ο μηχανισμός της αντιγραφής που επάγεται από θραύσεις δίκλωνου DNA (Break-induced Replication, BIR) θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο, αφού αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

A.5 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΘΡΑΥΣΕΙΣ ΔΙΚΛΩΝΟΥ DNA (Break-induced Replication, BIR)

Ο BIR μηχανισμός επιδιόρθωσης αποτελεί παράδειγμα ομόλογου ανασυνδυασμού κατά το οποίο, το ένα εκ των δύο άκρων του DSB, ευθύνεται για την έναρξη της διαδικασίας ανασυνδυασμού (Llorente et al., 2008). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αιτιολογηθεί είτε από την ικανότητα του ενός μόνο άκρου να εισχωρήσει στην ομόλογη, δίκλινη έλικα είτε από την ύπαρξη ενός μόνο ελεύθερου άκρου στο DSB, π.χ. λόγω μικρού μήκους τελομερούς

(Kraus et al., 2001, Donnianni & Symington, 2013). Μέσω του BIR, η αντιγραφή συνεχίζεται μέχρι το τέλος του τελομερούς και έτσι ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μη αμοιβαίων μετατοπίσεων (Donnianni & Symington, 2013).

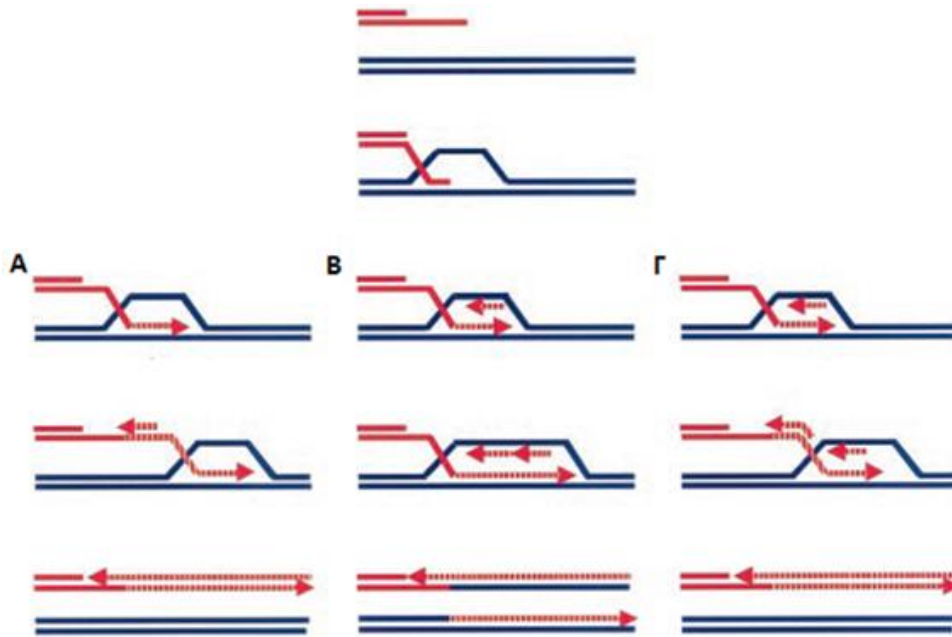
Στην πλειονότητά τους οι δίκλωνες θραύσεις επιδιορθώνονται από μονοπάτια που δεν επιφέρουν επιχιασμούς και κατ'επέκταση μειώνεται η απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity-LOH). Ωστόσο στην περίπτωση του BIR, που χρησιμοποιείται μόνο το ένα άκρο του DSB, παρατηρείται LOH σε μεγάλο βαθμό. Για όλα τα παραπάνω αποδίδεται στον BIR ένας εξαιρετικά μεταλλαξογόνος χαρακτήρας και παρεμποδίζεται σε περιπτώσεις ύπαρξης δύο άκρων του DSB, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επιδιόρθωση με πιο «συντηρητικούς» μηχανισμούς ομόλογου ανασυνδυασμού (Llorente et al., 2008). Η διαφορά του με τον SDSA μηχανισμό έχει να κάνει με το ότι ο BIR χρησιμοποιεί και τον leading και τον lagging strand για να κάνει σύνθεση DNA, εν αντιθέσει με τον SDSA που χρησιμοποιεί μόνο τον leading strand (Lydeard et al., 2007, Wang et al., 2004). Τέλος, ο BIR ενεργοποιείται κατά κύριο λόγο, στην περίπτωση που η διχάλα αντιγραφής έχει αποσυναρμολογηθεί πλήρως και όχι εάν έχει σταματήσει η διαδικασία αντιγραφής (Llorente et al., 2008, Costantino et al., 2014), ενώ αποτελεί έναν καλά διατηρημένο μηχανισμό που υπάρχει από τους φάγους μέχρι τα ευκαρυωτικά κύτταρα και τον άνθρωπο (Malkova & Ira, 2013)

Τα περισσότερα πειράματα εξακρίβωσης του ακριβούς μηχανισμού BIR πραγματοποιήθηκαν στο *Saccharomyces cerevisiae* (Dunn et al., 1984, Vollrath et al., 1988, Morrow et al., 1997). Σύμφωνα με τις περιγραφές, ο BIR είναι μηχανισμός μη αμοιβαίου ανασυνδυασμού, κατά τον οποίο η περιοχή του DSB που βρίσκεται πλησιέστερα στο κεντρομερές του χρωμοσώματος, εισχωρεί σε ομόλογη, δίκλωνη αλληλουχία, ενώ η αντίθετη πλευρά του DSB παραμένει αδιόρθωτη ή χάνεται (Bosco & Haber, 1998). Η πολυμεράση Pol32 είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA (Lydeard et al., 2007, Llorente et al., 2008), ενώ φαίνεται πως ο μηχανισμός εξαρτάται κυρίως από τη δράση της πρωτεΐνης Rad52 και όχι απαραίτητα από τη δράση της Rad51, όπως συμβαίνει με τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Malkova et al., 1996, Bosco & Haber, 1998, Bai & Symington, 1996).

A.5.1 Πιθανοί μηχανισμοί BIR

Το 2001 η ομάδα του Δρ. Haber πρότεινε τρία εναλλακτικά σενάρια, που θα μπορούσαν να επιβεβαιώνουν το μηχανισμό (Kraus et al, 2001). Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, πραγματοποιείται εισχώρηση του μονόκλωνου τμήματος στη δίκλωνη αλυσίδα-δότη δημιουργώντας θηλιά (D-loop), η οποία εν συνεχεία μετακινείται προς όλο το μήκος του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα (Formosa & Alberts, 1986). Η διαδικασία αυτή είναι ανάλογη με τον τρόπο που η RNA πολυμεράση αντιγράφει το DNA, μετατοπίζοντας τη μία αλυσίδα από το νεοσυντιθέμενο DNA (Εικόνα 10Α). Ακολούθως, η θηλιά αποσυναρμολογείται με το νεοσυντιθέμενο, μονόκλωνο άκρο να χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση του ασυνεχούς κλώνου και όλο το νεοσυντιθέμενο DNA να συνδέεται με το αρχικά σπασμένο άκρο (Kraus et al., 2001). Εναλλακτικά, η θηλιά (D-loop) θα μπορούσε να μετατραπεί σε διχάλα αντιγραφής μονής κατεύθυνσης, η οποία μετακινείται κατά μήκος του χρωμοσώματος που χρησιμοποιείται ως μήτρα (Εικόνα 10Β). Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη δημιουργία δύο μορίων που έχουν αντιγραφεί με ημισυντηρητικό τρόπο και σε ένα Holliday junction που θα πρέπει να λυθεί (Kraus et al., 2001). Τέλος, σύμφωνα με την τρίτη εκδοχή, η σύνθεση των νέων κλώνων γίνεται παράλληλα με την μετακίνηση της θηλιάς. Ακολούθως, οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι μετατοπίζονται, με αποτέλεσμα η αντιγραφή του DNA να γίνει με συντηρητικό τρόπο (Kraus et al., 2001) (Εικόνα 10Γ).

Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση ο BIR μηχανισμός επιδιόρθωσης παρουσιάζει ένα μοναδικό χαρακτηριστικό. Η D-θηλιά που σχηματίζεται κατά την εισχώρηση της 3' προεξοχής διαμορφώνεται σε μοναδικό χiasμα τύπου Holliday, το οποίο έχει την ικανότητα να μετακινείται κατά μήκος του χρωμοσώματος, μετατρέπόμενο σε θηλιά αντιγραφής (Donnianni and Symington, 2013, Saini et al., 2013, Wilson et al., 2013). Κατ' επέκταση, η σύνθεση συνεχίζεται μέχρι το τέλος του χρωμοσώματος (Llorente et al., 2008). Αντίθετα, στους υπόλοιπους μηχανισμούς του ομόλογου ανασυνδυασμού, η σύνθεση του νέου κλώνου εκτείνεται μέχρι ένα σημείο και ακολουθεί η ανασύνδεση του υπόλοιπου τμήματος του DSB.



Εικόνα 50. Εναλλακτικά σενάρια πραγματοποίησης του BIR μηχανισμού επιδιόρθωσης (Kraus et al., 2001)

A.5.2 Σύνδεση ALT και BIR μηχανισμού

Οι ζύμες είναι ο οργανισμός στον οποίο έχουν γίνει οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τον BIR και πως αυτός συνδέεται με τον ALT μηχανισμό. Πιο συγκεκριμένα, στο *S. cerevisiae*, η απώλεια της τελομερικής ενεργότητας οδηγεί σε προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών, οδηγώντας σε γήρανση (Lundblad & Szostak, 1989). Παρ' όλα αυτά, το 0,01% του κυτταρικού πληθυσμού "survivors" διαφεύγει της γήρανσης και επιβιώνει χρησιμοποιώντας ανασυνδυαστικούς μηχανισμούς για την επιμήκυνση των τελομερών τους.

Από μελέτες σε πληθυσμούς που δε φέρουν ενεργότητα της τελομεράσης, δύο τύποι "survivors" έχουν παρατηρηθεί στο *S. Cerevisiae* και διακρίνονται μεταξύ τους από τη δομή των τελομερών αλλά και τις απαιτήσεις τους σε πρωτεΐνες (Lundblad, 2002, *McEachern & Haber*, 2006). Παρ' όλα αυτά, και οι δύο τύποι απαιτούν της ύπαρξη της Pol32 (Lydeard et al., 2007). Ο Τύπος I χαρακτηρίζεται από πολλαπλές επαναλήψεις υποτελομεριδιακών περιοχών στα χρωμοσωμικά άκρα (Lundblad and Blackburn, 1993, Nabetani and Ishikawa, 2011), ενώ η επίτευξη του ανασυνδυασμού εξαρτάται κυρίως από τη δράση της ρεκομπινάσης Rad51 αλλά και της Rad52 (Chen et al., 2001). Επιπλέον, τα τελομερή του Τύπου I εμφανίζουν μικρό μήκος (Lue and Yu, 2016) κάτι που μπορεί να σχετίζεται με την αργή ανάπτυξη των κυττάρων αυτών (Teng et al. 2000; Teng and Zakian 1999). Εν αντιθέσει,

ο Τύπος II χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τελομερών μεγάλου μήκους, εξ ου και η πιο γρήγορη ανάπτυξη τους σε σχέση με τα τύπου I, και υψηλής ετερογένειας στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Teng et al. 2000; Teng and Zakian 1999). Επιπλέον, οι βασικές πρωτεΐνες που απαιτούνται είναι η Rad50, του συμπλόκου MRN, η Rad52 και άλλες πρωτεϊνών, όχι όμως η Rad51 (Le et al., 1999, Lue and Yu, 2016), ενώ χρησιμοποιεί ως μήτρα και κυκλικό, εξωχρωμοσωμικό DNA (Llorente et al., 2008). Λόγω άμεσης συσχέτισης του ALT μηχανισμού με την ύπαρξη κυκλικού, εξωχρωμοσωμικού DNA, φαίνεται, πως ο τύπος II προσομοιάζει τον ALT μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών στον άνθρωπο (Lue and Yu, 2016).

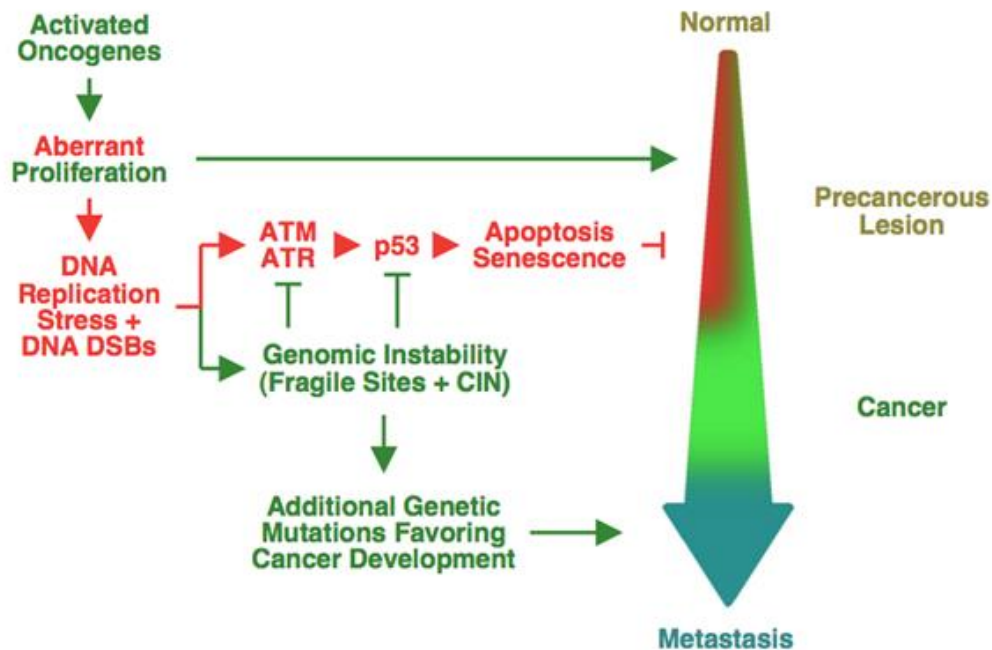
Επιπλέον, το γεγονός ότι και για τους δύο τύπους απαιτείται η χρήση της Pol32, υπομονάδας της πολυμεράσης δ, σημαντικής για τον BIR αλλά όχι για την αντιγραφή γενικότερα, συνδέει τον ALT μηχανισμό επιμήκυνσης με τον BIR μηχανισμό επιδιόρθωσης στο ζυμομύκητα (Lydeard et al., 2007, Symington et al., 2014, Sotiriou et al., 2016). Τέλος, αν και στο ζυμομύκητα, η ρεκομπινάση Rad52 φαίνεται πως δεν είναι ειδική για τον μηχανισμό BIR αλλά εμπλέκεται και σε άλλους μηχανισμούς (Symington, 2002), στα θηλαστικά η Rad52 είναι ιδιαίτερα σημαντική για το BIR μηχανισμό επιδιόρθωσης, σε περιπτώσεις αποσυναρμολόγησης διχάλων αντιγραφής ALT κυτταρικών σειρών (Sotiriou et al., 2016).

A.5.3 Ο BIR μηχανισμός στον άνθρωπο

Αν και ο μηχανισμός του BIR μελετάται σχεδόν δύο δεκαετίες, η ύπαρξή του στον άνθρωπο αποδείχθηκε για πρώτη φορά το 2014 από το εργαστήριο του Δρ. Χαλαζωνίτη.

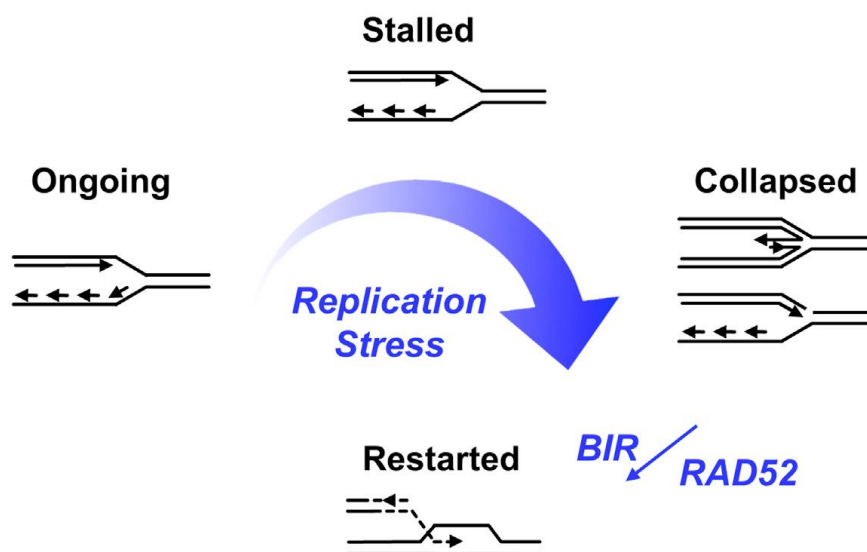
Σε παλαιότερη συνεργασία τους με το Δρ. Γοργούλη, πρότειναν ένα μοντέλο κατά το οποίο ενεργοποιημένα ογκογονίδια επάγουν την αποσυναρμολόγηση της διχάλας αντιγραφής του DNA, οδηγώντας σε στρες της αντιγραφής και DNA DSBs (Halazonetis et al., 2008)(Εικόνα 11). Το επόμενο βήμα ήταν να αποσαφηνιστούν τα μονοπάτια επιδιόρθωσης των αποσυναρμολογημένων διχάλων. Χρησιμοποιώντας την κυκλίνη E ως βασικό επαγωγέα αντιγραφικού στρες, μελέτησαν τις πρωτεΐνες που συμμετείχαν στα μονοπάτια επιδιόρθωσης και ανακάλυψαν το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης POLD3, που αποτελεί ορθόλογη μορφή της Pol32. Εξέτασαν ακόμα την τέταρτη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ- POLD4, και βρέθηκε πως και αυτή μαζί με την POLD3 απαιτούνται για τη

συνέχιση του κυτταρικού κύκλου στις περιπτώσεις όπου το στρες της αντιγραφής προέρχεται από ενεργοποιημένο ογκογονίδιο.



Εικόνα 61. Μοντέλο ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου βασισμένο σε βλάβες DNA επαγόμενες από ενεργοποιημένα ογκογονίδια. (Halazonetis et al., 2008)

Τέλος, σημαντικές μελέτες των τελευταίων ετών, απέδειξαν πως σε ανθρώπινα κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, ο BIR είναι RAD52 εξαρτώμενος και RAD51-ανεξάρτητος (Sotiriou et al., 2016, Min et al., 2017)(Εικόνα 12).



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση διαμορφώσεων της διχάλας αντιγραφής, ύστερα από επαγωγή αντιγραφικού στρες και έναρξη επιδιόρθωσης μέσω BIR και της πρωτεΐνης Rad52 (Sotiriou et al., 2016)

A.6 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη και η διερεύνηση της τελομερικής δυσλειτουργίας και του στρες της αντιγραφής ως παράγοντες δημιουργίας και ενίσχυσης της χρωμοσωμικής αστάθειας.

Το πρώτο βήμα προς την κατανόηση της χρωμοσωμικής αστάθειας σε σχέση με την τελομερική δυσλειτουργία σε καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, έγινε μέσω της μελέτης των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων NR2C/F, σε μια προσπάθεια συμβολής στην κατανόηση της χρωμοσωμικής αστάθειας προς την ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικότερων προγνωστικών, διαγνωστικών ή ογκοθεραπευτικών μεθόδων.

Το δεύτερο βήμα προς την κατανόηση της χρωμοσωμικής αστάθειας σε σχέση με το στρες της αντιγραφής σε ALT καρκινικά κύτταρα, έγινε μέσω της μελέτης του μηχανισμού ομόλογου ανασυνδυασμού BIR. Τα βασικά ερωτήματα που τέθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής είναι:

- Ευθύνεται ο BIR για τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών στον άνθρωπο?
- Ο μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών συνδέεται με συντηρητικό τρόπο αντιγραφής του DNA?
- Είναι δυνατόν να πιστοποιήσουμε την ύπαρξη συντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής του DNA στο μικροσκόπιο?
- Σχετίζεται η εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών με τη δράση των υπομονάδων 3 και 4 της πολυμεράσης δ στον άνθρωπο?

Οι απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα μπορούν να αποτελέσουν εφελθήρια για νέες μελέτες στο κατά πόσο παράγοντες που προκαλούν στρες της αντιγραφής, μπορούν να πυροδοτήσουν το ALT μονοπάτι. Ενώ η ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μηχανισμό αυτό όπως η RAD52, δύναται να αποτελέσει ένα καινούριο στρατηγικό μονοπάτι στην καταπολέμηση του καρκίνου.

B. Υλικά και Μέθοδοι

B.1 Διατήρηση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Υλικά

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

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου εμβρυονικών κυττάρων του πνεύμονα (VA-13 WI38), η οποία παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του Prof. C.M. Azzalin (ETH), και η καρκινική κυτταρική σειρά ανθρώπινου επιθηλιακού οστεοσαρκώματος U2Os. Οι κυτταρικές καλλιέργειες διατηρούνται και αναπτύσσονται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (Forma), Steri-Cycle-CO₂ με φίλτρο HEPA Class 100 στον οποίο διατηρείται σταθερή θερμοκρασία 37°C, με συγκέντρωση 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%.

B.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιείται DMEM θρεπτικό υλικό, συμπληρωμένο με 10% v/v βόειο εμβρυϊκό ορό FBS. Για την προστασία των καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες προστίθενται στο θρεπτικό υλικό αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις των 100 μg/mL πενικιλίνης και 100 μg/mL. Το διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS) απενεργοποιείται με την επώαση του σε θερμοκρασία 65°C για 30 min. Η παρασκευή του υλικού καλλιέργειας, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Η μορφολογία και η ανάπτυξη των κυττάρων παρατηρούνται με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν καλούνται adherent cells χάρη στην ιδιότητά τους να προσκολλώνται στον πυθμένα των φλασκών και να συγκροτούν μονοστιβάδες. Όταν καλύψουν το 85-95% του εμβαδού της επιφάνειας της φλάσκας δημιουργούν ογκίδια και συσσωματώματα και για την αποφυγή τέτοιων φαινομένων απαιτείται ανακαλλιέργεια. Απορρίπτεται το υπερκείμενο της φλάσκας και πραγματοποιούνται 2 πλυσίματα με PBS 1X, προστίθεται θρυψίνη 1X και επώάζονται για 1 λεπτό στους 37°C. Τα κύτταρα αποκολλώνται

από την επιφάνεια της φλάσκας, λόγω της θρυψίνης που πέπτει παροδικά τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων και συγκεντρώνονται στο υπερκείμενο. Μετά την προσθήκη DMEM που απενεργοποιεί τη θρυψίνη τα κύτταρα αναδεύονται και μεταφέρονται σε άλλες φλάσκες για ανακαλλιέργεια.

B.1.2 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ειδικά μικρά αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία (cryo-vials) στους -80°C απ' όπου μπορούν να αποψυχθούν και να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια. Τα κύτταρα αμέσως πριν καταψυχθούν αφαιρούνται από την φλάσκα, με την ίδια μέθοδο που γίνεται και η ανακαλλιέργεια, και προστίθενται επιπλέον 10% DMSO, το οποίο δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας για τα κύτταρα.

Όσον αφορά τη διαδικασία απόψυξης των κυττάρων τα cryo-vial μεταφέρονται από τον καταψύκτη σε υδατόλουτρο, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία 37°C και ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου Falcon με PBS 1X, αναδεύονται ελαφρά και φυγοκεντρώνονται στις 1000rpm για 10 λεπτά στους 4°C . Ακολουθούν 2 ξεπλύματα με 1x PBS και τοποθετούνται σε φλάσκα με 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM). Τα ξεπλύματα με 1x PBS αποσκοπούν στην πλήρη απομάκρυνση του DMSO (κρυοπροστατευτική ουσία) το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα.

B.1.3 Ακτινοβόληση κυττάρων.

Με στόχο τη δημιουργία επιζήμιων για το κύτταρο βλαβών και την περεταίρω έρευνα των διασωθέντων πληθυσμών, ακτινοβολήθηκαν VA13 κύτταρα με 2,4Gy γ-ακτινοβολίας στον g-cell ακτινοβολητή (Atomic Energy of Canada) με αναλογία δόσης 0.5 Gy/min. Ακολούθησε επώαση τους για ένα ολόκληρο κυτταρικό κύκλο, σύν 1 ώρα για κάθε Grey ακτινοβολίας, και η ανακαλλιέργεια τους. Η συλλογή των μεταφάσεων έγινε μετά από 48 ώρες συνολικής καλλιέργειας. Το χρονικό πλαίσιο επώασης καθορίστηκε έτσι ώστε τα κύτταρα να έχουν προλάβει να επιδιορθώσουν τα σπασίματα που θα έχουν προκληθεί από την ακτινοβολία και θα μπορούν πλέον να ολοκληρώσουν το μιτωτικό κύκλο. Η ακτινοβόληση των κυττάρων έγινε στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» με τη βοήθεια της Δρ. Τερζούδη.

B.2 Συλλογή μεταφασικών χρωμοσωμάτων

Υλικά

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

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

B.3 Φθορίζων In Situ υβριδισμός -FISH στα τελομερή (PNA-FISH)

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

τους από νουκλεάσες. Η ιδιότητα αυτή τους καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτικούς στην αποδόμηση.

Υλικά

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

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται με διάλυμα 2x SSC για 1-2 λεπτά και στη συνέχεια επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C με 100 µL διαλύματος RNase/πλακάκι. Μετά το πέρας της 1 ώρας, μεταφέρονται σε 2x SSC για 1-2 λεπτά με σκοπό της αφαίρεση της καλυπτρίδας και ακολούθως σε διάλυμα 1x TBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το επόμενο βήμα είναι η εμβύθιση σε φορμαλδεΐδη 3,7% για 2 λεπτά ακριβώς και δύο πλύσεις με 1x TBS για 5 λεπτά η καθεμία. Προκειμένου να απομακρυνθούν οι ιστόνες και να «ανοίξουν» τα χρωμοσώματα, τα πλακάκια εμβαπτίζονται σε προθερμασμένη κυβέτα στους 37°C που φέρει πεψίνη. Ακολουθούν πλύσεις σε 1x TBS και αφυδάτωση των κυττάρων σε αυξανόμενης συγκέντρωσης παγωμένη αιθανόλη (70%, 85% και 96%). Ο τελομερικός ανιχνευτής προστίθεται στα δείγματα αραιωμένος σε διάλυμα υβριδισμού τελικού όγκου 10µL/πλακάκι. Παρουσία του ανιχνευτή, τα δείγματα μετουσιώνονται στους 80°C για 5min και έπειτα επωάζονται για 1h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

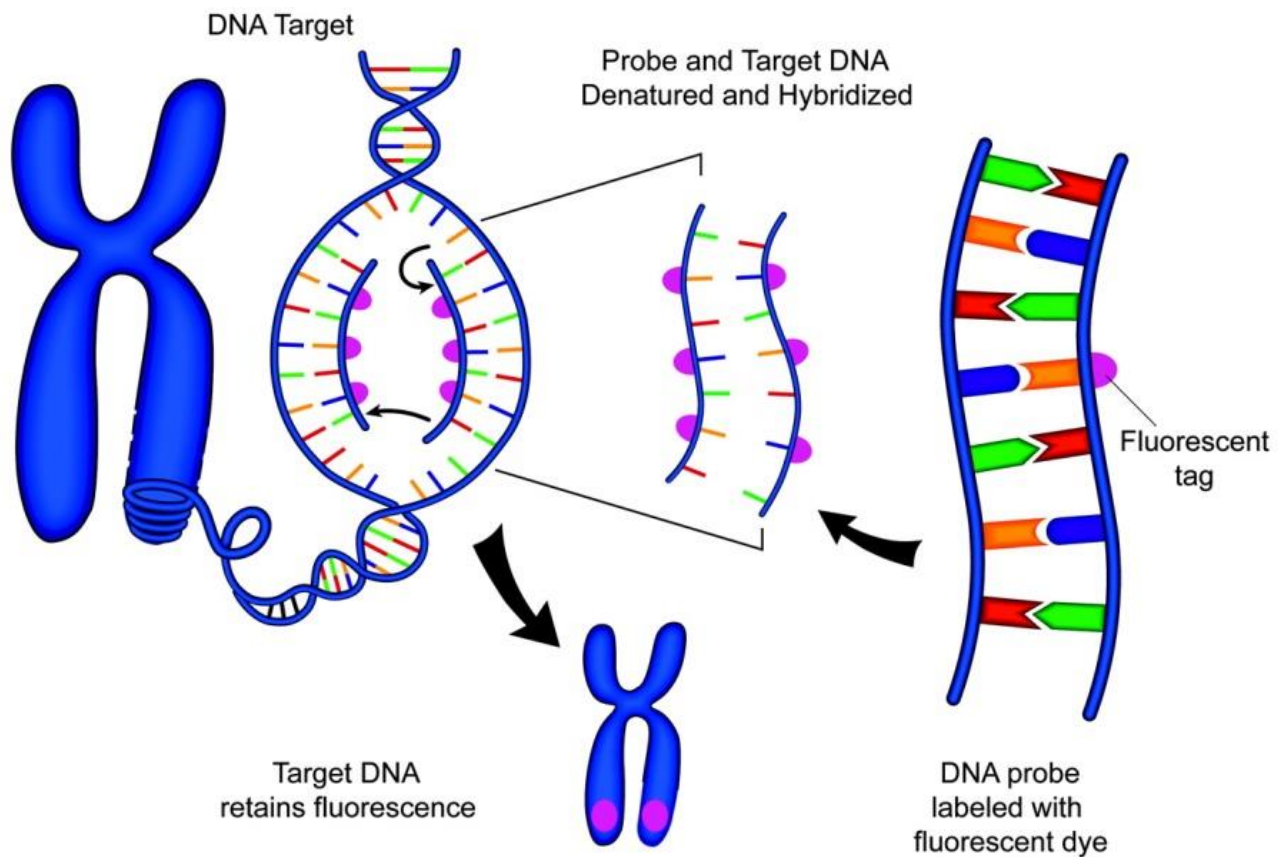
Το στάδιο της υβριδοποίησης ακολουθούν πλύσεις σε 1xPBS για 2-3 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η καλυπτρίδα και στη συνέχεια τα πλακάκια τοποθετούνται σε κυβέτα, που περιέχει προθερμασμένο διάλυμα έκπλυσης, στους 65°C για 5 λεπτά. Ακολουθούν δύο

πλύσεις με PBS 1x στο σκοτάδι και υπό ανάδευση για 15 λεπτά η κάθε μία, αφυδάτωση με μία σειρά από παγωμένες αιθανόλες συγκέντρωσης 70%, 85% και 96% για 2 λεπτά κάθε φορά και αφήνονται να στεγνώσουν στο αέρα. Τέλος, τα παρασκευάσματα καλύπτονται με DAPI.

B.4 Ποσοτικοποίηση τελομερικού μήκους μέσω φθορίζοντα In situ υβριδισμού (Q-FISH Quantitative fluorescence in situ hybridization)

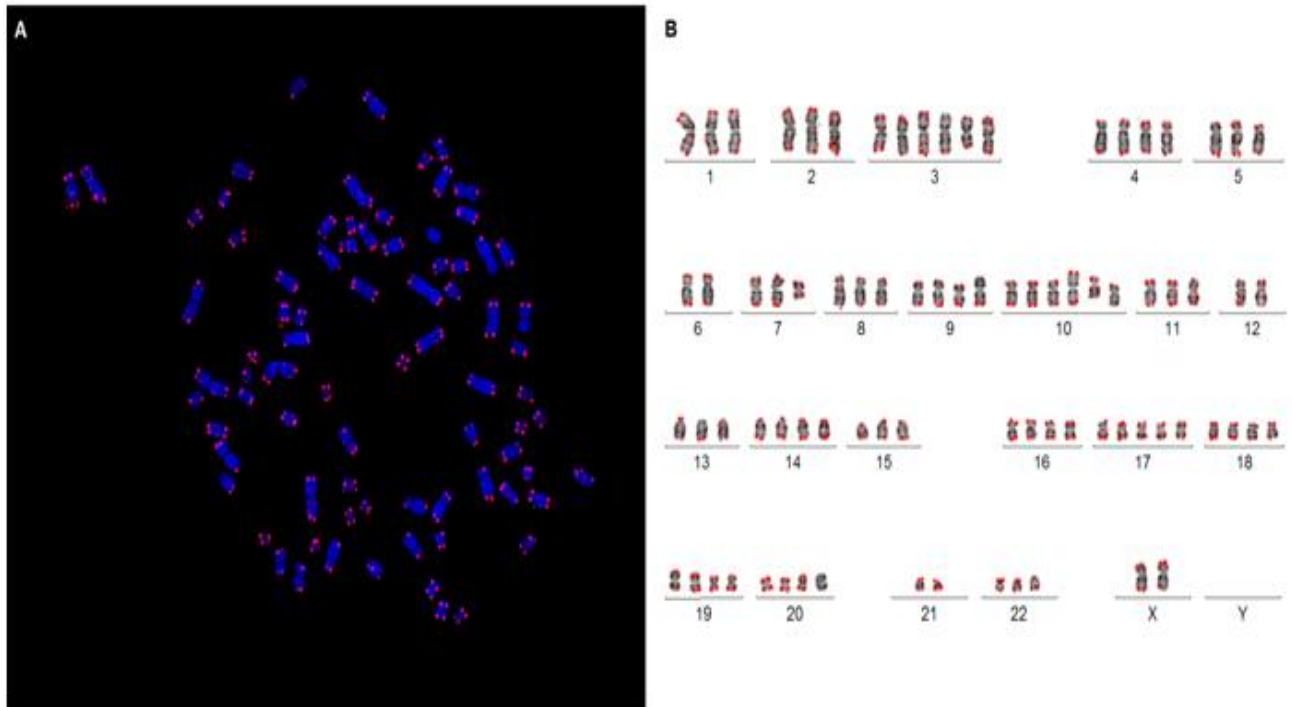
Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα εργαλείο μέτρησης τελομερικού μήκους. Βασίζεται στην απεικόνιση, μέσω ανιχνευτών που φέρουν φθοριοχρώματα, και μέτρηση της συνολικής έντασης φθορισμού των τελομερικών άκρων. Η ένταση αυτή είναι ανάλογη του τελομερικού μήκους.

Πειραματικά η διαδικασία είναι ίδια με του προαναφερθέντος PNA-FISH. Οι περιοχές των τελομερών υβριδίζονται με τους σημασμένους ανιχνευτές και το δείγμα μελετάται σε ορθό μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής FISH (Wirrpold & Perry, 2007).

Για τα συγκεκριμένα πειράματα έχει επιλεγθεί ο Cy3-σημασμένος (TTAGGG)₃ PNA-ανιχνευτής που φθορίζει στα 568nm. Μέρος της διαδικασίας αποτελεί η φωτογράφιση μεταφάσεων, των παρασκευασμάτων που λαμβάνονται. Οι φωτογραφίες αυτές επεξεργάζονται, καρυστυπούνται και πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση του φθορισμού με χρήση του λογισμικού ISIS (Meta Systems). Οι μεταφάσεις που χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα είναι ~25, μια εξ' αυτών απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 2).



Εικόνα 29. Απεικόνιση μετάφασης που λαμβάνεται με μικροσκόπιο φθορισμού (Α) καρυστυπική ανάλυση της μετάφασης με χρήση του λογισμικού ISIS (Β). Τα κόκκινα σήματα αντιπροσωπεύουν τα τελομερή.

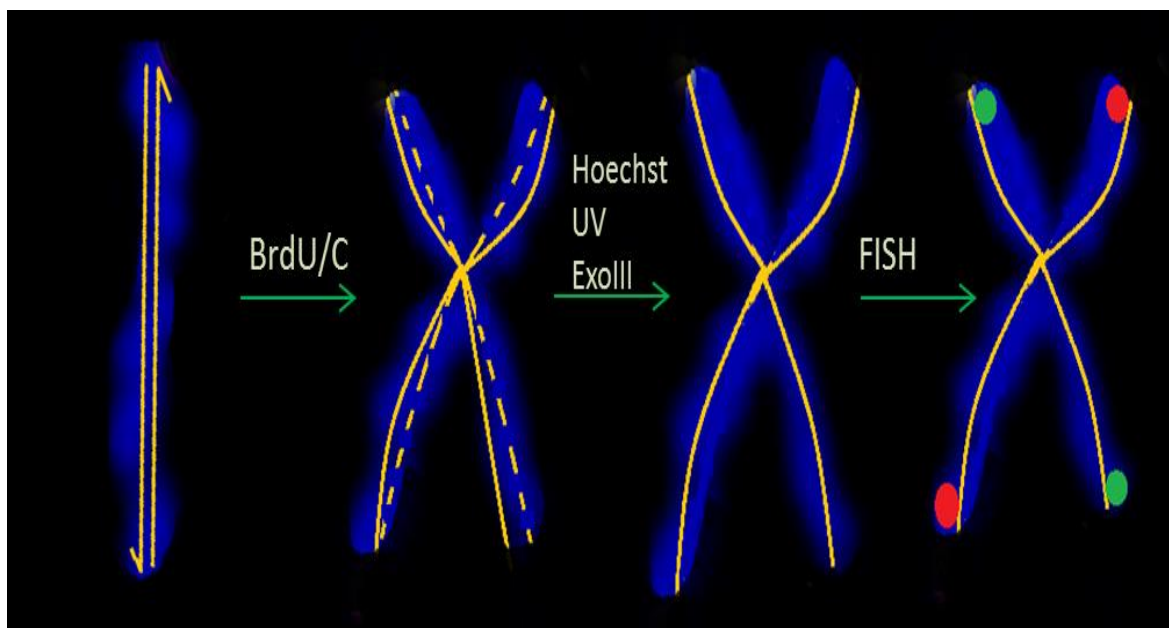
B.5 Προσδιορισμός του χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού με φθορίζων in-situ υβριδισμό (CO-FISH Chromosome orientation fluorescence in situ hybridization)

Υλικά

- Brd U/C [Sigma]
- Hoechst 33258 (0,5 µg/mL) [Sigma] σε 2x SSC
- 1xPBS [Gibco]

- Εξωνουκλεάση – EXOIII [New England Biolabs]
- Διαλύματα αιθανόλης, CH₃CH₂OH: 70%, 85%, 96%
- Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10 mM, φορμαμίδιο 70% [Cytocell]
- PNAτελομερικοί ανιχνευτές (Probes) 10 μM: Red – Cy3-σημασμένοι (TTAGGG)₃, Green – FITC-σημασμένοι (CCCTAA)₃ [Biosynthesis]
- Διάλυμα έκπλυσης I: Φορμαμίδιο 70%, BSA 0,1%, H₂O, Tris-HCl 10mM pH 7-7,5
- Διάλυμα έκπλυσης II: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 0.08%, pH 7.4
- Διάλυμα DAPI 0,1μg/mL & Vectashield [Vector Laboratories]

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αποδόμηση των νεοσυντιθέμενων κλώνων των τελομερών, με τη χρήση BrdU/C, και τον υβριδισμό των πατρικών με του ειδικούς τελομερικούς ανιχνευτές μονής κατεύθυνσης (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Αναπαράσταση των χρωμοσωμάτων στη τεχνική CO-FISH.

Πριν γίνει η συλλογή των κυττάρων, προστίθεται στις καλλιέργειες κατάλληλη ποσότητα BrdU/C και παραμένει για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (~12-16 ώρες), το οποίο εξαρτάται από την κυτταρική σειρά. Τα ανάλογα της κυτοσίνης και της θυμίνης (βρωμοουριδίνη και βρωμοκυτοσίνη) ενσωματώνονται στη διπλή έλικα κατά την αντιγραφή του DNA. Για να έχουμε επιθυμητά αποτελέσματα τα κύτταρα πρέπει να ενσωματώσουν

την ουσία κατά την αντιγραφή του γενετικού τους υλικού (first round) και να γίνει συλλογή τους, πριν προχωρήσουν σε ένα δεύτερο κύκλο διαίρεσης. Τα κύτταρα που έχουν προχωρήσει σε δεύτερο κύκλο αντιγραφής, μετά τον υβριδισμό τους με τους ανιχνευτές, εμφανίζουν κίτρινα σήματα.

Μετά τη συλλογή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται με 1xPBS για 10 λεπτά και στη συνέχεια επώάζονται σε διάλυμα Hoechst 33258 για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκθεση σε UV ακτινοβολία (0,180 J, 365 nm) για 45 λεπτά. Η Hoechst αλληλεπιδρά με τα μόρια της BrdU/C και με την επίδραση της UV ακτινοβολίας δημιουργούνται σπασίματα στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Στη συνέχεια προστίθεται εξωνουκλεάση III (δράση 5'-3') για 15 λεπτά στους 37 °C, η οποία εντοπίζεται στις περιοχές, όπου υπάρχουν τα σπασίματα και κατακερματίζει τον νεοσυντιθέμενο κλώνο. Το πρώτο στάδιο ολοκληρώνεται με διαδοχικές εμφυτεύσεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 85%, 100%) για 2 λεπτά κάθε φορά και αφήνονται να στεγνώσουν καλά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η διαδικασία συνεχίζεται με το στάδιο του υβριδισμού, το οποίο ξεκινά με 10λεπτη επώαση σε διάλυμα υβριδισμού και μετά την αφαίρεση αυτού, προσθήκη 0,08 μL κόκκινου ανιχνευτή διαλυμένο σε 9,92 μL διαλύματος υβριδισμού και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους και υγρασίας. Μετά το πέρας της μίας ώρας, οι πλάκες εκπλένονται με διάλυμα έκπλυσης I για 5 λεπτά στο σκοτάδι για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ανιχνευτή που δεν έχει υβριδοποιηθεί και στη συνέχεια προστίθενται 0,16 μL πράσινου ανιχνευτή σε 9,84 μL διαλύματος υβριδισμού, ο οποίος παραμένει στις ίδιες συνθήκες για 1 ώρα. Ακολουθούν πλύσεις με διαλύματα έκπλυσης I (2 φορές για 15 λεπτά η κάθε μία) και II (3 φορές για 5 λεπτά η κάθε μία), με 1x PBS (2 φορές για 15 λεπτά η κάθε μία) και αφυδάτωση των πλακών με διαδοχικές εμφυτεύσεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 85%, 100%) για 2 λεπτά κάθε φορά. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι και προστίθεται μικρή ποσότητα DAPI.

B.6 Πολυχρωματική ανάλυση φθορίζοντα in-situ υβριδισμού (M-FISH-multicolor fluorescence in situ hybridization)

Υλικά

- 0.1x SSC, pH 7.0-7.5
- 2x SSC, pH 7.0-7.5
- NaOH 0.07 mol/l
- Διαλύματα αιθανόλης, CH₃CH₂OH: 70%, 95%, 100%
- 0,4x SSC, pH 7.0-7.5
- 2x SSCT (SSC2x, pH 7.0-7.5 containing 0.05% Tween20)

Η πολυχρωματική ανάλυση FISH, είναι μία ακόμα τεχνική που βασίζεται στο φθορίζοντα In Situ υβριδισμό, με τη μόνη διαφορά ότι πλέον δε σημαίνονται συγκεκριμένες αλληλουχίες, αλλά ολόκληρο το χρωμόσωμα. Μετά την αποδιάταξη του DNA, ακολουθεί η υβριδοποίηση με τους DNA ανιχνευτές, ενώ η μη δεσμευμένη ποσότητα των ανιχνευτών ξεπλένεται από ειδικά διαλύματα απουσία φορμαμίδης. Το DNA βάφεται με DAPI και είναι έτοιμο για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Αναλυτικά, η διαδικασία ξεκινάει με το στάδιο τα αποδιάταξης. Τα παρασκευάσματα τοποθετούνται για 30 λεπτά στους 70°C σε 2x SSC . Μετά το πέρας της μισής ώρας τα αφήνουμε να κρυώσουν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχίζουμε με διαδοχικές πλύσεις σε: 0.1x SSC για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, 0.07N NaOH για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, 0.1x SSC για 1 λεπτό στους 4°C και 2x SSC για 1 λεπτό στους 4°C. Ακολουθεί το στάδιο της αφυδάτωσης με την χρήση παγωμένων διαλυμάτων αιθανόλης συγκέντρωσης 70%, 95% και 100% αντίστοιχα και οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Το στάδιο της υβριδοποίησης είναι το επόμενο βήμα. Πριν την χρήση τους, οι DNA ανιχνευτές πρέπει και αυτοί με τη σειρά τους να αποδιαταχθούν. Για αυτό τοποθετείται η απαραίτητη ποσότητα στους 75°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια για μισή ώρα στους 37°C. Μόλις στεγνώσουν τα παρασκευάσματα προστίθεται ο ανιχνευτής και επωάζονται για 4 μέρες στους 37°C. Δύο πλύσεις με 0,4x SSC στους 72°C και με 2x SSCT σε θερμοκρασία

αντίστοιχα, απομακρύνουν την ποσότητα του μη υβριδοποιημένου ανιχνευτή και τέλος η προσθήκη DAPI καθιστά τα πλακάκια έτοιμα προς παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

B.7 Συνδυασμός πολυχρωματικής- τελομερικής και κεντρομεριδικής ανάλυσης με τη χρήση του φθορίζοντα in-situ υβριδισμού

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η φύση των αναδιατάξεων στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα VA13 και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των τελομερών και των κεντρομεριδίων σε αυτές, προβήκαμε στο συνδυασμό διαφόρων μεθόδων FISH. Ξεκινήσαμε με κεντρομεριδικό PNA- FISH (Panagene) που στόχευε όλα τα ανθρώπινα κεντρομερή. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ακολουθεί τις ίδιες αρχές με το PNA- FISH, με τη μόνη διαφορά στο χρόνο υβριδισμού που γίνεται καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθεί η διαδικασία του τελομερικού PNA-FISH χρησιμοποιώντας FITC-(CCCTAA)₃ σημασμένο ανιχνευτή PNA και η φωτογράφιση στο μικροσκόπιο κρατώντας τις ακριβείς συντεταγμένες της κάθε μετάφασης. Τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται σε 2xSSC για να φύγει η καλυπτρίδα και τελειώνει η πειραματική διαδικασία με το πρωτόκολλο του M-FISH, που περιγράφηκε παραπάνω, και τη μικροσκοπική παρατήρηση. Η καταγραφή των τυχαίων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων έγινε σύμφωνα με το ISCN 2013(International System for Human Cytogenetic Nomenclature).

B.8 Ακολουθία πειραμάτων τριπλού FISH

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος U2OS εκτίθενται σε περιβάλλον BrdU/C για έναν κύκλο αντιγραφής και στη συνέχεια επεξεργάζονται με διάλυμα κολχικίνης, με σκοπό την παραμονή των κυττάρων στη φάση της μίτωσης. Στη συνέχεια, έγινε παραλαβή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων με υποτονικό διάλυμα και τοποθέτηση τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

Πραγματοποιήθηκε in situ υβριδισμός με φθοροχρώματα (PNA FISH), υπό συνθήκες αποδιάταξης των δίκλωνων χρωμοσωμάτων, με χρήση και των δύο ανιχνευτών-ειδικών για κάθε τελομερικό κλώνο και οι καλύτερες, ως προς την ποιότητα, μεταφάσεις φωτογραφήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Στη συνέχεια, οι πλάκες αποχρωματίζονται με θέρμανση στους 72°C σε διάλυμα 2x SSC για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, οι ίδιες πλάκες υφίστανται φθορίζοντα in-situ υβριδισμό, με σκοπό τον προσδιορισμό του

χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού τους (CO-FISH), υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και με τη χρήση και των δύο τελομεριδιακών ανιχνευτών. Οι μεταφάσεις που επιλέχθηκαν προηγουμένως, φωτογραφίζονται εκ νέου, ενώ ακολουθεί αποχρωματισμός τους υπό τις ίδιες συνθήκες. Ως τρίτο πείραμα, πραγματοποιείται *in situ* υβριδισμός με φθοροχρώματα (PNA FISH), υπό αποδιατακτικές συνθήκες και με τη χρήση και των δύο τελομεριδιακών ανιχνευτών. Οι ίδιες μεταφάσεις φωτογραφίζονται ξανά και ακολουθεί επεξεργασία των φωτογραφιών και ανάλυση.

B.9 Μικροσκοπική παρατήρηση

Στη παρούσα διπλωματική εργασία απαιτήθηκε η χρήση των ακόλουθων μικροσκοπίων:

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

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

B.10 Στατιστική ανάλυση

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

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Η τελομερική παρείσφρηση μέσω πυρηνικών υποδοχέων σε ALT καρκίνους οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια

Ο κύκλος breakage-fusion-bridge (B/F/B cycle) είναι ένας κλασικός μηχανισμός πρόκλησης χρωμοσωμικής αστάθειας κατά τον οποίο δυσλειτουργικά τελομερή συγχωνεύονται με άλλα χρωμοσωμικά άκρα, δημιουργώντας δικεντρικά χρωμοσώματα που τελικά θα σπάσουν στη φάση της μίτωσης. Μέσω της παρούσης διατριβής, προσπαθήσαμε να αποκαλύψουμε την ύπαρξη ενός ξεχωριστού μονοπατιού πρόκλησης χρωμοσωμικής αστάθειας από τα τελομερή, σε κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό.

Σε προηγούμενες μελέτες αποδείχθηκε η συσχέτιση μεταξύ των τελομερών και των NR2C/F πυρηνικών υποδοχέων αποκλειστικά σε κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών (Déjardin & Kingston, 2009). Το αναπάντεχο αυτό εύρημα γέννησε πολλά ερωτηματικά, καθώς ως μεταγραφικοί παράγοντες οι πυρηνικοί υποδοχείς συνδέονται με περιοχές που φέρουν γονίδια, ενώ τα τελομερή δεν αποτελούν τις κλασικές θέσεις ύπαρξης γονιδίων.

Σε συνεργασία με το εργαστήριο του Jerome Dejardin προσπαθήσαμε να καταλάβουμε τη βιολογική σημασία του παραπάνω ευρήματος. Από τα πρώτα αποτελέσματα φάνηκε ο σημαντικός ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στον ALT μηχανισμό και στην αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος. Οι NR2C/F πυρηνικοί υποδοχείς βοηθούν στον ανασυνδυασμό μεταξύ των τελομερών, ενώ ταυτόχρονα προσελκύουν τελομερική χρωματίνη στα διάφορα σημεία πρόσδεσής τους πάνω στο γονιδίωμα. Αυτή η ιδιότυπη οργάνωση πυροδοτεί την παρείσφρηση τελομερικού υλικού στις θέσεις αυτές, και τη δημιουργία καινούριων εύθραυστων θέσεων, που ως γνωστών αποσταθεροποιούν το γονιδίωμα και είναι επιρρεπείς σε σπασίματα και μετατοπίσεις. Ο μηχανισμός αυτός επάγει τη γενωμική αστάθεια με τελείως διαφορετικό τρόπο από τον B/F/B κύκλο και για αυτό ονομάστηκε στοχευόμενες τελομερικές παρείσφρησεις- targeted telomere insertions (TTI). Σύμφωνα με τα παραπάνω, προτείνουμε τον μηχανισμό στοχευμένων τελομερικών παρείσφρησεων σαν ένα βασικό επαγωγέα της ετερογένειας του γονιδιώματος και της δημιουργίας σύνθετων καρυοτύπων σε ALT σαρκώματα (Marzec et al., 2015).

Γ.1.1 NR2C/F επαγόμενες τελομερικές παρεισφρήσεις σε σημεία θραύσεων δίκλωνου DNA σχετίζονται με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις σε ALT κύτταρα

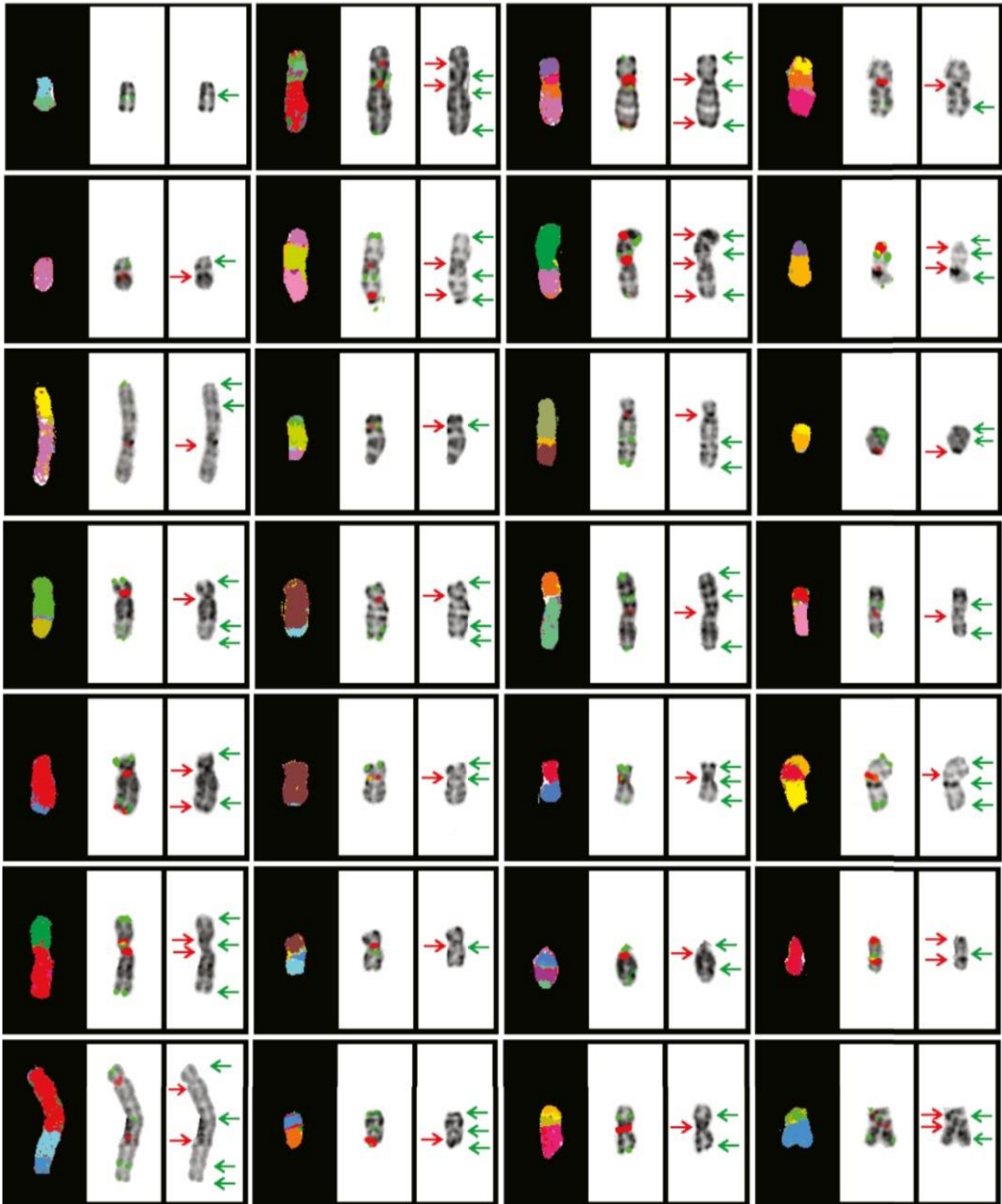
Η παρέισφρηση τελομερικού DNA μέσα στο γονιδίωμα δημιουργεί τα λεγόμενα ITS (Internal Telomere Sequences), και έχει αποδειχθεί η συσχέτισή τους με χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Kilburn et al., 2001). Επειδή τα ITS αποτελούν πιθανές εύθραυστες θέσεις-common fragile sites (CFS) (Bosco & De Lange, 2012), η προσθήκη τελομερικού DNA στο γονιδίωμα μέσω του ΤΤΙ μηχανισμού θα μπορούσε να θεωρηθεί ως πηγή χρωμοσωμικής αστάθειας.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε πως ο ΤΤΙ μηχανισμός είναι μία ενεργή διαδικασία επαγωγής χρωμοσωμικής αστάθειας σε ALT κύτταρα, το εργαστήριό μας ανέλαβε να επάγει DSBs και να ελέγξει για τυχόν τελομερική εισχώρηση στα σημεία των θραύσεων, με τη χρήση χρωμοσωμικών μεταφάσεων.

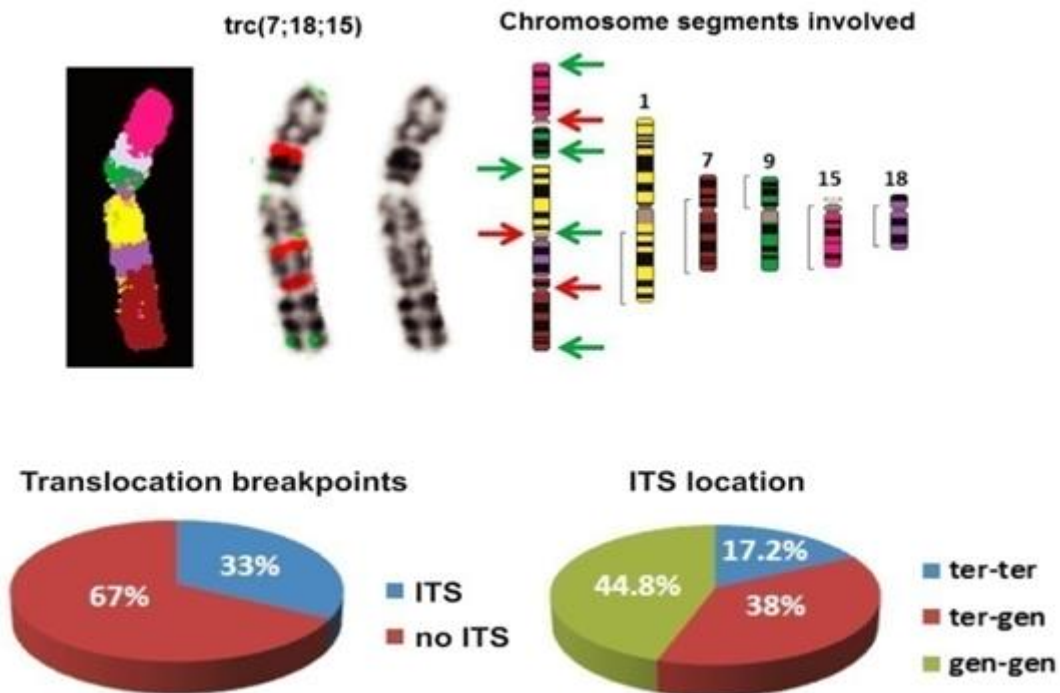
Ανθρώπινα μετασηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα- VA13, που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, ακτινοβολήθηκαν με 2,4Gy γ-ακτινοβολίας με στόχο τη δημιουργία DSBs. Ακολούθησε τελομερικός και κεντρομεριδιακός φθορίζοντας *in situ* υβριδισμός (FISH) σε συνδυασμό με την ανά κύτταρο πολυχρωματική ανάλυση FISH (M-FISH-multicolor fluorescence *in situ* hybridization /SKY-spectral karyotyping). Τα αποτελέσματα ανέδειξαν 88 μοναδικά σημεία θραύσης και σύζευξης διαφορετικών ομολόγων χρωμοσωμάτων ανάμεσα σε 693 αναλυθέντα χρωμοσώματα. Σε 29 (33%) από τα 88 σημεία τυχαίας θραύσης παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμες τελομερικές αλληλουχίες (Εικόνα 1). Από τα 29 σημεία θραύσης, 13 αφορούσαν μη τελομερικές γονιδιωματικές περιοχές, υποδεικνύοντας πως στοχευμένες τελομερικές παρεισφρήσεις είναι σύννηθες φαινόμενο σε ALT κύτταρα (15% των καταγεγραμμένων μετατοπίσεων), ιδίως κατά την επαγωγή γενotoξικού στρες (Εικόνα 2).

Συμπερασματικά και σύμφωνα προς τα αποτελέσματά μας, τελομερικό DNA ενσωματώνεται σε πολλαπλές θέσεις θραύσης του γονιδιώματος, με την βοήθεια των ορφανών μεταγραφικών παραγόντων NR2C/F. Οι παράγοντες NR2C/F στρατολογούν τελομερική χρωματίνη, αναγνωρίζουν την ειδική αλληλουχία 5'-GGGTCA-3', προάγουν δομικές αναδιατάξεις του γονιδιώματος και πιθανώς συνδέονται με την ανάπτυξη πολύπλοκων καρυότυπων στους ALT όγκους.

Recombinants with ITS



Εικόνα 1. 28 από 88 μη κλωνικά ανασυνδυασμένα χρωμοσώματα φέρουν εσωτερικές τελομερικές αλληλουχίες. Κύτταρα VA-13 48h μετά την έκθεσή τους σε 2.4Gy γ- ακτινοβολίας, σημασμένα με M-FISH, τελομερικό και κεντρομεριδιακό FISH και χρώση DAPI. Τα πράσινα και κόκκινα βελάκια δείχνουν τις χρωμοσωμικές περιοχές τελομερικών και κεντρομεριδιακών αλληλουχιών αντίστοιχα.



Εικόνα 2. (Πάνω αριστερά) SKY-FISH σε συνδυασμό με τελομερικό (πράσινο σήμα) και κεντρομεριδιακό (κόκκινο σήμα) FISH δείχνει εσωτερικά τελομερικά σήματα σε σημεία μετατόπισης μεταξύ των 1, 7, 9, 15, και 18 στην ALT+ VA-13 κυτταρική σειρά. (Πάνω δεξιά) Ιδεογραμματική αναπαράσταση των αναδιαταγμένων χρωμοσωμάτων. (Κάτω) Κατανομή των συμβάντων μετατόπισης με ή χωρίς την παρουσία ITS μετά από γ-ακτινοβολήση. *ter-ter*, μετατοπίσεις μεταξύ τελομερών; *ter-gen*, μετατοπίσεις μεταξύ τελομερών και γονιδιώματος; *gen-gen*, μετατοπίσεις μεταξύ γονιδιώματος.

Η παραπάνω μελέτη περιλαμβάνεται στο άρθρο “Nuclear-Receptor-Mediated Telomere Insertion Leads to Genome Instability in ALT Cancers” των Marzec P, Armenise C, Pérot G, Roumelioti FM, Gagos S, Chibon F, Déjardin J και δημοσιεύθηκε στο περιοδικό Cell (Marzec et al.,2015).

Γ.2 Ο ALT μηχανισμός στα ανθρώπινα κύτταρα είναι διαδικασία συντηρητικού τρόπου αντιγραφής του DNA με χαρακτηριστικά BIR

Οι ανθρώπινες κακοήθειες ξεπερνούν την αντιγραφική γήρανση είτε με την ενεργοποίηση της τελομεράσης είτε με την ενεργοποίηση του ALT μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών. Στις ζύμες έχει αποδειχθεί πως ο ALT μηχανισμός παρουσιάζει χαρακτηριστικά BIR και οδηγεί σε συντηρητικό τρόπο αντιγραφής του DNA. Στα ανθρώπινα κύτταρα, αν και έχει αποδειχθεί η ύπαρξη και η συμμετοχή του μηχανισμού

BIR σε περιπτώσεις αποσυναρμολόγησης διχάλων αντιγραφής (Costantino et al., 2014), δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί ο ρόλος του στον ALT μηχανισμό. Επιπλέον, ο BIR στα θηλαστικά εξαρτάται από την πολυμεράση PolD3, την ορθόλογη μορφή της Pol32 που βρίσκεται στις ζύμες, Η παραδοχή αυτή μας οδηγεί στην υπόθεση πως όπως και στις ζύμες, έτσι και στα θηλαστικά, ο BIR θα είναι μία συντηρητική διαδικασία αντιγραφής, κάτι που μένει να εξακριβωθεί.

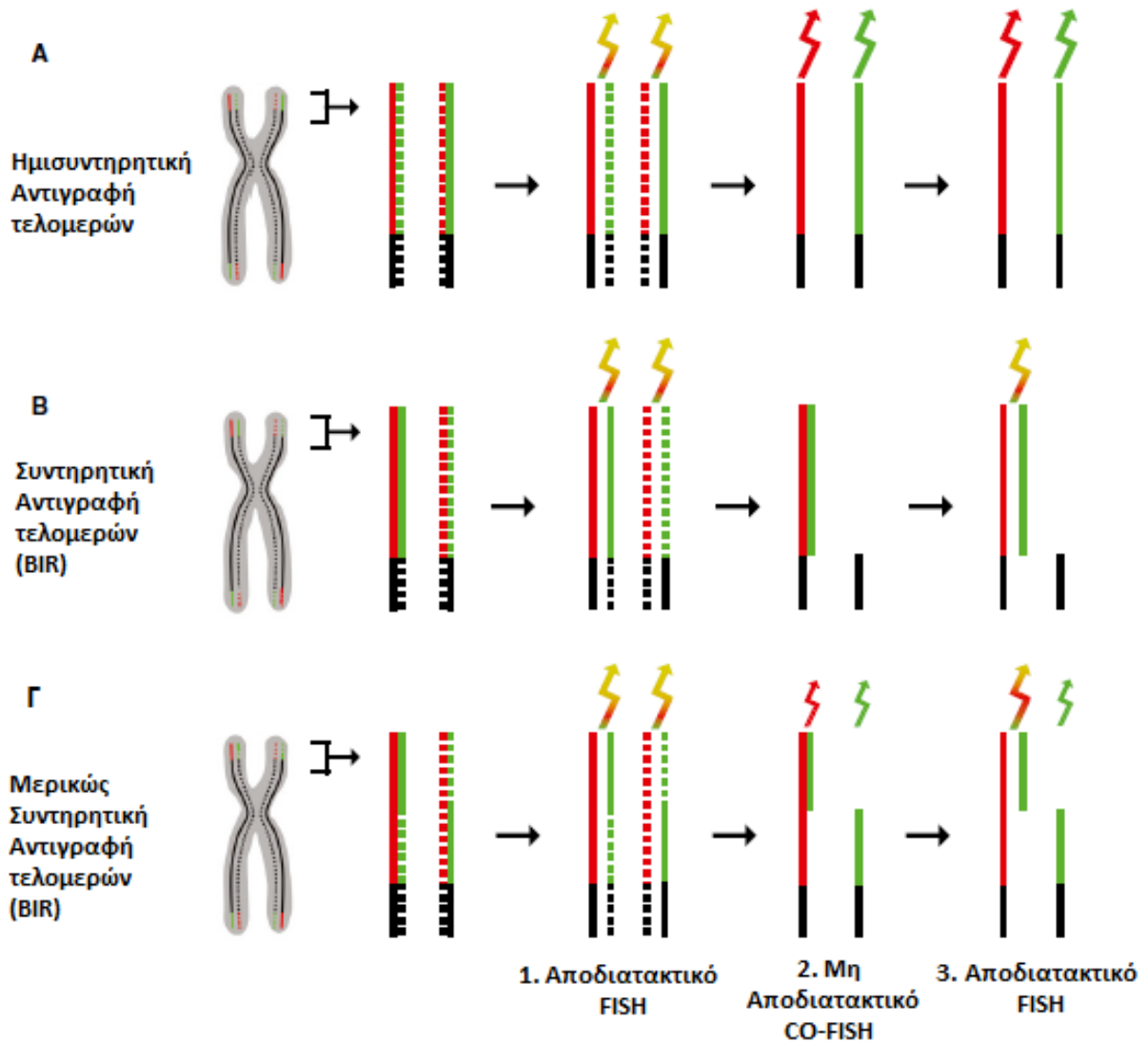
Στη παρούσα διδακτορική διατριβή θα εξετάσουμε το κατά πόσο ο ALT παρουσιάζει χαρακτηριστικά BIR και πως η αποσιώπηση των PolD3/PolD4 επηρεάζει το μήκος των τελομερών. Τέλος θα διερευνήσουμε την παρουσία συντηρητικού τρόπου αντιγραφής στο τελομερικό DNA.

Γ.2.1 Ανθρώπινα ALT τελομερή παρουσιάζουν εκτεταμένα τμήματα συντηρητικά συντιθέμενου DNA

Προκειμένου να καταστεί σαφής διαχωρισμός μεταξύ συντηρητικού και μη τρόπου αντιγραφής σε τελομερή ανθρώπινων καρκίνων, βασιστήκαμε στο γεγονός ότι οι δύο τελομερικές DNA αλυσίδες μπορούν να διακριθούν χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές αναγνώρισης κλώνων πλούσιων σε G και C αντίστοιχα.

Ανθρώπινα, καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος U2OS καλλιεργήθηκαν παρουσία αντιδραστηρίων βρώμο-2-δεοξουριδίνης (BrdU) και βρώμο-2-δεοξυκυτοσίνης (BrdC), τα οποία αποτελούν μοριακά ανάλογα της θυμιδίνης, για έναν κύκλο αντιγραφής. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε τριπλό πρωτόκολλο Φθορίζοντος in situ Υβριδισμού (Fluorescent in situ hybridization, FISH)(Εικόνα 3).

Αρχικά, στα χρωμοσώματα πραγματοποιήθηκε τελομερικό FISH, δύο χρωμάτων, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο επιτρέπει την αναγνώριση και των δύο κλώνων, μέσω αντίστοιχου χρωματισμού, αποτελώντας αναφορά για τα ακόλουθα πειράματα. Μετά τον αποχρωματισμό των χρωμοσωμάτων, ακολουθεί προσδιορισμός του χρωμοσωμικού τελομεριδιακού προσανατολισμού με φθορίζοντα in-situ υβριδισμό (CO-FISH), δύο χρωμάτων, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες αυτή τη φορά. Σ' αυτό το στάδιο, ο νεοσυντιθέμενος κλώνος έχει αποδομηθεί και λόγω των μη αποδιατακτικών συνθηκών του πειράματος, οι ανιχνευτές προσδένονται μόνο στους πατρικούς κλώνους, που έχουν αντιγραφεί ημισυντηρητικά (Εικόνα 3A).



Εικόνα 10. Πρωτόκολλο τριπλού FISH για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση του ημισυντηρητικού και του συντηρητικού τρόπου αντιγραφής (Roumelioti et al., 2016)

Σε αντίθεση με τον ημισυντηρητικό τρόπο αντιγραφής, στα τελομερή που έχουν αντιγραφεί με συντηρητικό τρόπο, δεν προσδένονται οι ανιχνευτές, εφόσον στη μία αδελφή χρωματίδα οι δύο πατρικοί κλώνοι συνδέονται μεταξύ τους, ενώ στην άλλη οι νεοσυντιθέμενοι έχουν αποδομηθεί (Εικόνα 3B). Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει διαχωρισμός μεταξύ ημισυντηρητικά αντιγραφόμενων και συντηρητικά αντιγραφόμενων τελομερών. Ακολούθως, ύστερα από αποχρωματισμό, τα χρωμοσώματα υφίστανται για τρίτη φορά κατεργασία μέσω φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) δύο χρωμάτων, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη του συντηρητικού τρόπου αντιγραφής που παρατηρήθηκε κατά το προηγούμενο πείραμα. Τα τελομερή που έχουν αντιγραφεί με ημισυντηρητικό τρόπο θα δώσουν τον ίδιο ακριβώς φαινότυπο με το προηγούμενο πείραμα (Εικόνα 3A), σε αντίθεση με τα συντηρητικώς αντιγραφόμενα

τελομερή, που θα εμφανίσουν σήμα (Εικόνα 3B), αποκλείοντας την περίπτωση τεχνικού προβλήματος.

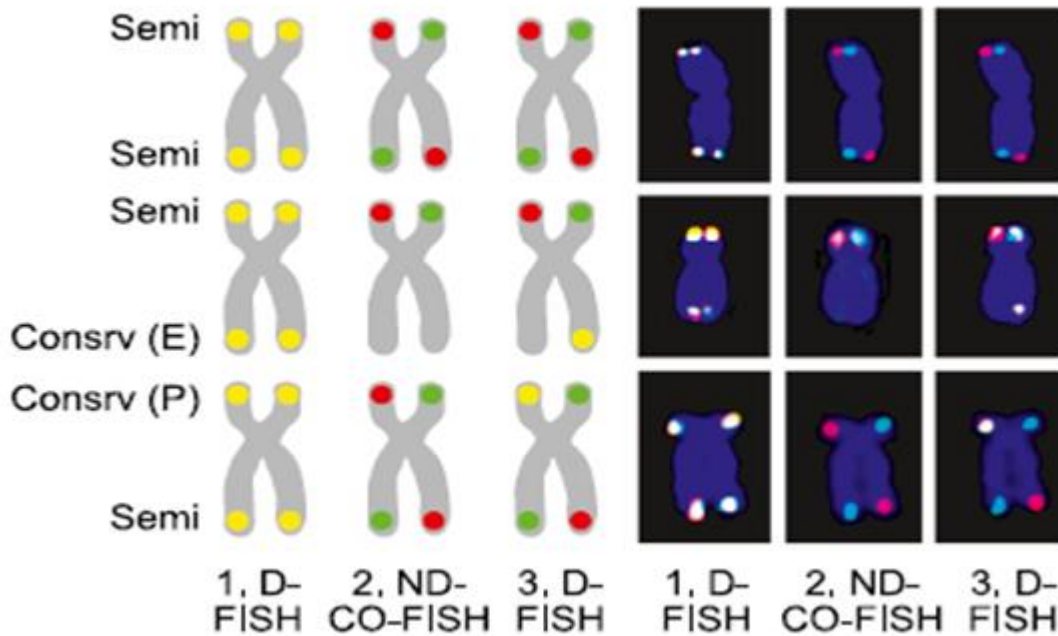
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως μέσω της τεχνολογίας του τριπλού FISH μπορούν να ταυτοποιηθούν περιπτώσεις τελομερών που αντιγράφονται μερικώς ημισυντηρητικά και μερικώς συντηρητικά. Η περίπτωση της μερικώς συντηρητικής αντιγραφής μπορεί να προέρχεται από αποσυναρμολόγηση της διχάλας αντιγραφής μέσα στο τελομερές και ολοκλήρωση της αντιγραφής μέσω του μηχανισμού BIR (Εικόνα 3Γ).

Το πρωτόκολλο του τριπλού FISH που περιγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε σε αθανатоποιημένη, κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS, που χρησιμοποιεί τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών, ALT. Στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με πλασμιδιακό DNA προκαλώντας υπερέκφραση της κυκλίνης E, γεγονός που οδήγησε στην επαγωγή αντιγραφικού στρες (Bartkova et al., 2005, Costantino et al., 2014). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το αντιγραφικό στρες οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση της διχάλας αντιγραφής, η οποία επιδιορθώνεται μέσω του μηχανισμού BIR. Συμπερασματικά λοιπόν, υπερεκφράζοντας την κυκλίνη E, τα φαινόμενα βλαβών στη διχάλα αντιγραφής αυξάνονται, επομένως θα περιμέναμε αύξηση των φαινοτύπων BIR, άρα και του συντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής.

Ακολούθως εξετάστηκαν μεταφάσεις κυττάρων που εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα κυκλίνης E (normal expression, NE) καθώς και κύτταρα που υπερεκφράζουν την κυκλίνη E (over expression, OE). Στο σύνολο εξετάστηκαν 75 μεταφάσεις για κάθε περίπτωση (25 μεταφάσεις ανά πείραμα, το οποίο επαναλήφθηκε τρεις φορές), που αντιστοιχούν σε 10.830 και 11.538 χρωμοσωμικούς βραχιόνες από NE και OE κύτταρα. Από το σύνολο των χρωμοσωμικών βραχιόνων, μόνο το 5% εμφάνισε υψηλής ποιότητας πειραματική απόκριση και στα τρία πειράματα του πρωτοκόλλου (Εικόνα 4) και μπόρεσε να κατηγοριοποιηθεί σε κάποιον από τους φαινοτύπους που περιγράφηκαν στην Εικόνα 3.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η πλειονότητα των χρωμοσωμικών βραχιόνων εμφάνισαν φαινότυπο που υποδηλώνει τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αντιγραφής του DNA των τελομερών. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό των τελομερών αντιγράφεται με συντηρητικό τρόπο (Εικόνα 5). Πιο συγκεκριμένα, τα ποσοστά ανέρχονται στο 11% των τελομερών, κυττάρων U2OS με φυσιολογική έκφραση κυκλίνης E (NE) και στο 17% των τελομερών, κυττάρων με υπερέκφραση κυκλίνης E (OE). Το ένα πέμπτο των συντηρητικά

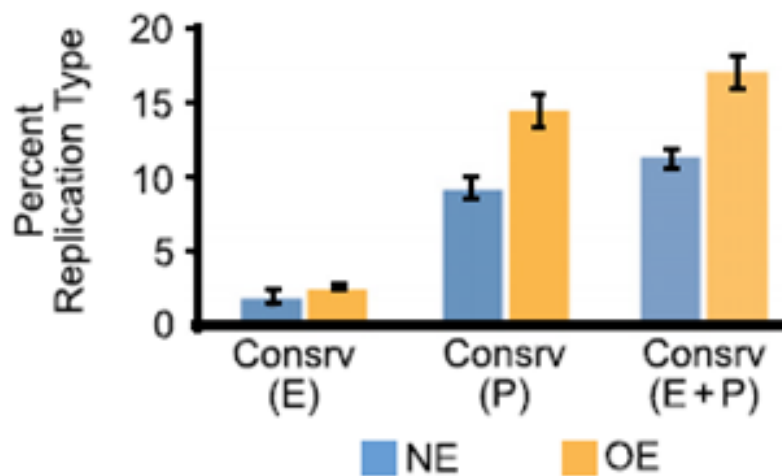
αντιγραφόμενων τελομερών αντιγράφεται συντηρητικά σε όλο του το μήκος (Entire telomere length, E), ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα πέμπτα αντιγράφονται μερικώς συντηρητικά (Part of the telomere, P) (Εικόνα 5).



Εικόνα 4. Παραδείγματα χρωμοσωμικών βραχιόνων που παρουσιάζουν ημισυντηρητική (*Semi-conservative, Semi*) αντιγραφή τελομερών, συντηρητική (*Conservative, Consrv*) αντιγραφή ολόκληρου του τελομερικού μήκους (*E*) και συντηρητική αντιγραφή μέρους του τελομερούς (*P*). Χρωμοσωμικά σχεδιαγράμματα (αριστερά) και πραγματικά χρωμοσώματα (δεξιά). Αποδιατακτικό FISH (*Denaturing FISH, D-FISH*), Μη αποδιατακτικό CO-FISH (*Non-Denaturing CO-FISH*)

Τα ποσοστά των χρωμοσωμικών βραχιόνων που εμφανίζουν συντηρητικό μοτίβο αντιγραφής φαίνεται πως παρουσιάζουν επαναληψιμότητα σε μεγάλο βαθμό, ωστόσο εξαρτώνται κατά πολύ από τα ποσοστά των μετρήσιμων χρωμοσωμικών βραχιόνων, που κυμαίνονται στο 5% των συνολικών βραχιόνων. Το μικρό ποσοστό οφείλεται στο γεγονός της αξιολόγησης μόνο των χρωμοσωμάτων που εμφανίζουν άριστη ποιότητα και στα τρία πειράματα FISH. Επιπλέον, από την ανάλυση αποκλείστηκαν τελομερή που εμφανίζουν φαινόμενα ανταλλαγής τελομερών αδελφών χρωματίδων (*Telomeric Sister-Chromatid Exchanges, T-SCEs*) (Londoño-Vallejo et al., 2004). Τελομερή με T-SCEs, στο δεύτερο πείραμα FISH (CO-FISH), υβριδίζονται και με τους δύο ανιχνευτές, καθιστώντας αδύνατη την κατηγοριοποίηση τους ως συντηρητικής ή ημισυντηρητικής αντιγραφόμενα.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, πως το μικρότερο δυνατό μήκος τελομερών που μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση των PNA ανιχνευτών είναι περίπου 200 ζεύγη βάσεων (Martens et al., 1998)). Επομένως, σε συνδυασμό με την ευαισθησία ανίχνευσης που είναι πολύ πιθανό να μειώνεται με τα επάλληλα πειράματα στα ίδια μιτωτικά παρασκευάσματα, υπολογίζουμε πως τα κυτταρογενετικά ορατά τελομερικά σήματα κυμαίνονται από μερικές εκατοντάδες έως λίγες χιλιάδες ζεύγη βάσεων.

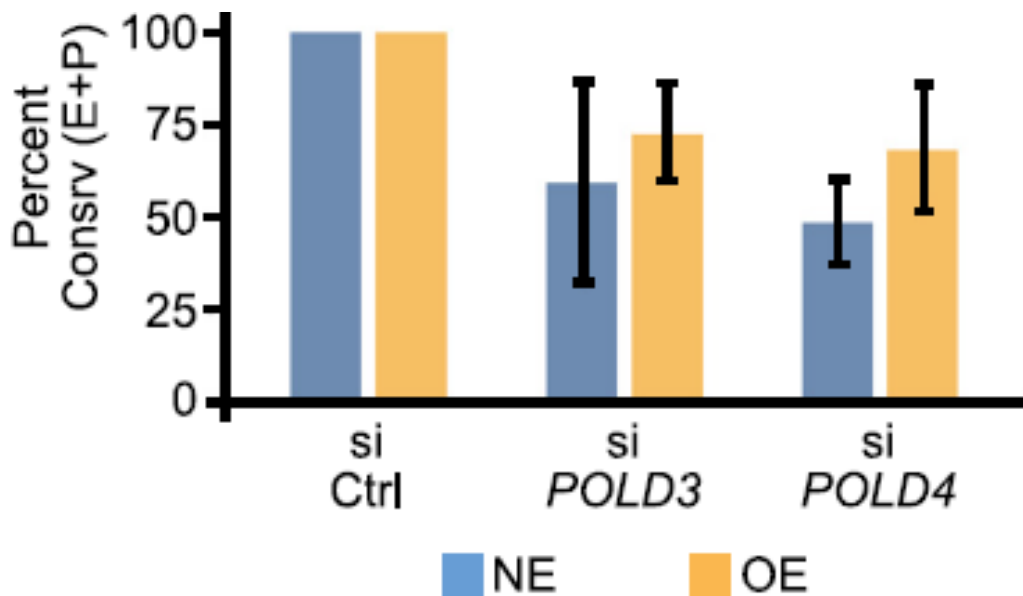


Εικόνα 5. Ποσοστά χρωμοσωμικών βραχιόνων που παρουσιάζουν συντηρητική (Consv) αντιγραφή ολόκληρου του τελομερούς (E), μέρους του τελομερούς (P) και το άθροισμά τους (E+P). NE, U2OS κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα κυκλίνης E, OE, U2OS κύτταρα που υπερεκφράζουν κυκλίνη E για 4 μέρες. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η υπερέκφραση της κυκλίνης E οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά συντηρητικώς αντιγραφόμενων τελομερών: $P < 0.025$ για Consv (P) και $P < 0,05$ για Consv (P+E), όπως υπολογίστηκε μέσω στατιστικής ανάλυσης με *paired t-test* (Roumelioti et al., 2016)

Γ.2.2 Απώλεια έκφρασης των PoID3 και PoID4 καταστέλλει τη συντηρητική αντιγραφή και επηρεάζει την τελομερική λειτουργία

Η παρουσία συντηρητικώς αντιγραφόμενου τμήματος DNA στα τελομερή των ALT κυττάρων αυξάνει την πιθανότητα ο ALT μηχανισμός να είναι BIR εξαρτώμενος. Για να μελετήσουμε αυτή την πιθανότητα σε βάθος, εξετάσαμε αν η αποσιώπηση των υπομονάδων PoID3 και PoID4 της πολυμεράσης δ, μέσω siRNA, επηρεάζει τη συχνότητα των τελομερών που εμφανίζουν συντηρητικό τρόπο αντιγραφής, αφού και οι δύο είναι βασικές πρωτεΐνες του BIR μηχανισμού.

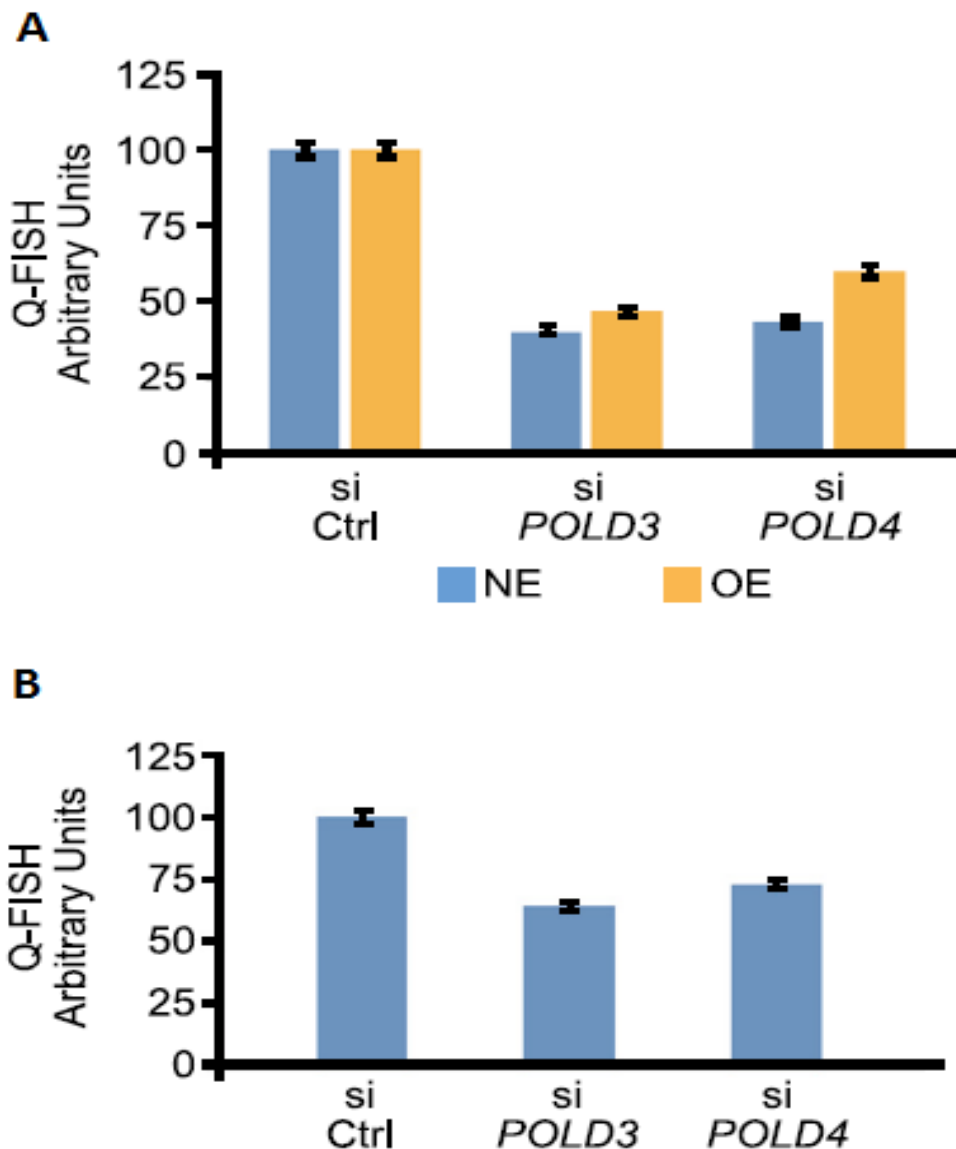
Πειραματικά χρησιμοποιήσαμε U2OS κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα (NE) της κυκλίνης E και κύτταρα που υπερεκφράζουν την κυκλίνη E (OE). Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα εξακρίβωσης, όπου στο πρώτο μετρήθηκαν 25 μεταφάσεις κυττάρων για κάθε περίπτωση (NE και OE), ενώ στο δεύτερο πείραμα μετρήθηκαν 10 μεταφάσεις για κάθε περίπτωση. Η προσωρινή απώλεια έκφρασης των PolD3 και PolD4 δεν επηρέασε τα συνολικά ποσοστά των μετρήσιμων χρωμοσωμικών βραχιόνων. Ωστόσο, φάνηκε πως τα ποσοστά των συντηρητικώς αντιγραφόμενων τελομερών μειώνονται σημαντικά, τόσο στην περίπτωση των NE όσο και στην περίπτωση των OE (Εικόνα 6). Η αποσιώπηση της PolD4 είχε μεγαλύτερο αντίκτυπο σε σχέση με την απώλεια της PolD3, αυτό όμως έχει να κάνει με την μη επαρκή αποσιώπηση της πρωτεΐνης μέσω siRNA.



Εικόνα 6. Η συντηρητική αντιγραφή των τελομερών εξαρτάται από τις PolD3 και PolD4. Μείωση του ποσοστού των χρωμοσωμικών βραχιόνων που παρουσιάζουν φαινοτύπους συντηρητικής τελομερικής αντιγραφής ολόκληρου και μέρους του τελομερικού μήκους (E+P) σε U2OS κύτταρα, ύστερα από απώλεια έκφρασης των υπομονάδων PolD3 και PolD4, μέσω siRNA. SiCtrl: siRNA ελέγχου, NE: U2OS κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα κυκλίνης E, OE: U2OS κύτταρα που υπερεκφράζουν κυκλίνη E για 4 μέρες. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Για στατιστική ανάλυση, οι επιδράσεις της απώλειας έκφρασης των PolD3 και PolD4 μελετήθηκαν ύστερα από ένωση των τιμών για την κάθε περίπτωση NE και OE. Η απώλεια έκφρασης της PolD3 μειώνει τα ποσοστά συντηρητικού φαινοτύπου αντιγραφής των τελομερών με $P=0,072$, ενώ η απώλεια έκφρασης της PolD4 έδειξε στατιστική σημαντικότητα με $P<0,025$, όπως υπολογίστηκε μέσω στατιστικής ανάλυσης με *paired t-test* (Roumelioti et al., 2016)

Προκειμένου να ισχυροποιηθεί η συσχέτιση μεταξύ ALT και BIR, συνεχίσαμε την έρευνα πάνω στο πως η αποσιώπηση της PolD3 ή PolD4 αντίστοιχα, επηρεάζει το τελομερικό μήκος και τα φαινόμενα σύντηξης μεταξύ τελομερών διαφορετικών

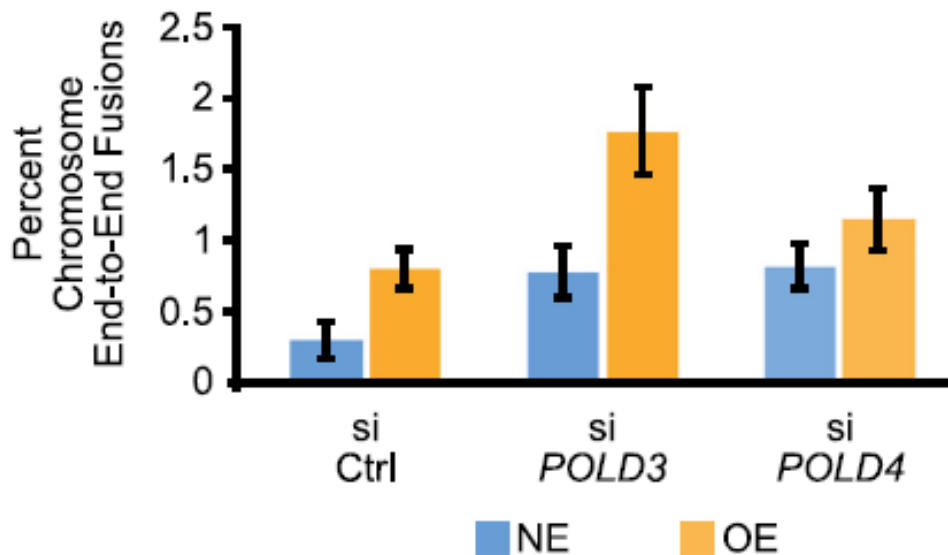
χρωμοσωμάτων. Το τελομερικό μήκος μετρήθηκε μετά από κατεργασία τριών ημερών με siRNA, και ποσοτικοποιήθηκε μέσω χρήσης συγκεκριμένου πρωτοκόλλου Q-FISH τόσο σε κύτταρα U2OS με NE και OE κυκλίνης E (Εικόνα 7A), όσο και σε κύτταρα U2OS αγρίου τύπου (Εικόνα 7B). Σε κάθε περίπτωση, η απώλεια έκφρασης των *Pold3* και *Pold4* μειώνει σημαντικά το τελομερικό μήκος.



Εικόνα 7. Το τελομερικό μήκος εξαρτάται από τις *Pold3* και *Pold4*. **(A)** Σε U2OS κύτταρα με φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης κυκλίνης E (NE) και υπερέκφραση της κυκλίνης E (OE), η απώλεια έκφρασης των *Pold3* και *Pold4* προκαλεί μείωση του τελομερικού μήκους. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα περισσότερων από 2.600 τελομερών που μετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές τόσο στα NE όσο και στα OE κύτταρα με $P < 10^{-6}$, όπως αναλύθηκε μέσω unpaired t-test. **(B)** Μείωση τελομερικού μήκους και στην περίπτωση απώλειας έκφρασης των *Pold3* και *Pold4* σε πατρικά U2OS κύτταρα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα περισσότερων από 2.800 τελομερών που μετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με $P < 10^{-6}$, όπως αναλύθηκε μέσω unpaired t-test (Roumelioti et al., 2016)

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της απώλειας έκφρασης των PolD3 και PolD4 στα φαινόμενα σύντηξης μεταξύ τελομερών διαφορετικών χρωμοσωμάτων, σε κύτταρα που εκφράζουν κυκλίνη E σε φυσιολογικά επίπεδα (NE) και σε κύτταρα με υπερέκφραση της κυκλίνης E (OE). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα φαινόμενα σύντηξης αυξάνονται, επάγοντας το αντιγραφικό στρες μέσω κυκλίνης E (Εικόνα 8).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων απέδειξαν πως η καταστολή του BIR μηχανισμού, μέσω της αποσιώπησης βασικών πρωτεϊνών δράσης του, όπως η PolD3 και PolD4, οδηγεί σε μεταβολές του τελομερικού μήκους και της τελομερικής λειτουργίας σε κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών.



Εικόνα 8. Η τελομερική λειτουργία εξαρτάται από τις PolD3 και PolD4. Αυξημένη συχνότητα φαινομένων σύντηξης μεταξύ τελομερών, ύστερα από απώλεια έκφρασης των PolD3 και PolD4. Για κάθε περίπτωση, εξετάστηκαν 25 μεταφάσεις (~1.900 χρωμοσωμικοί βραχίονες υψηλής ποιότητας ανά περίπτωση), υπολογίστηκαν τα ποσοστά των φαινομένων σύντηξης για κάθε μετάφωση και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του μέσου όρου και του τυπικού σφάλματος. Για στατιστική ανάλυση, ο αριθμός των χρωμοσωμικών συντήξεων συγκρίθηκαν μέσω *chi-square tests*. Η υπερέκφραση της κυκλίνης E οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά συντήξεων ($P < 0,0005$), ενώ στις περιπτώσεις μειωμένης έκφρασης PolD3 και PolD4 βρέθηκαν πάλι αυξημένα ποσοστά συντήξεων ($P < 0.001$ and $P < 0.025$, αντίστοιχα)(Roumelioti et al., 2016)

Δ. Συζήτηση

Το πρώτο βήμα προς την κατανόηση της σχέσης της τελομερικής δυσλειτουργίας και χρωμοσωμικής αστάθειας σε κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, έγινε μέσω της μελέτης των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων NR2C/F. Περιγράψαμε έναν άλλο μηχανισμό χρωμοσωμικής αστάθειας προερχόμενης από τελομερική δυσλειτουργία, που εμφανίζεται στις περιπτώσεις που ενεργοποιείται ο ALT μηχανισμός. Σε αντίθεση με τη γενωμική σταθεροποίηση που προκαλεί η ενεργοποίηση της τελομεράσης, ο ALT μηχανισμός αποσταθεροποιεί το γονιδίωμα μέσω του μηχανισμού στοχευμένης τελομερικής παρείσφρησης (TTI). Με βάση τα παραπάνω προτείνουμε ότι ο μηχανισμός TTI συνεισφέρει στους περίπλοκους καρυοτύπους που χαρακτηρίζουν τους καρκίνους ή τις κυτταρικές σειρές όπου ο ALT μηχανισμός είναι ενεργοποιημένος.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς NR2C/F κάτω από την επίδραση γενετοξικού στρες επάγουν την παρείσφρηση τελομερικών αλληλουχιών διάσπαρτα στο γονιδίωμα. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στην παραδοχή, πως στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, οι πυρηνικοί υποδοχείς δε λειτουργούν μόνο σα μεταγραφικοί παράγοντες, αλλά πυροδοτούν και τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις.

Εν κατακλείδι, ο TTI μηχανισμός οδηγεί στην εμφάνιση αλλά και διατήρηση περίπλοκων μεταλλαξιγόνων φαινοτύπων με δύο τρόπους: (1) η παρείσφρηση τελομερικού DNA σε ρυθμιστικές περιοχές πιθανότητα επηρεάζει τη ρύθμιση και γειτονικών γονιδίων και (2) τα σημεία όπου έχει παρεισφρήσει η τελομερική αλληλουχία είναι επιρρεπή σε σπασίματα που με τη σειρά τους οδηγούν σε χρωμοσωμική αστάθεια. Το μέγεθος των τελομερικών αλληλουχιών, δεδομένου των ορίων ανίχνευσης των PNA ανιχνευτών, μπορεί να είναι από κάποιες εκατοντάδες μέχρι κάποιες χιλιάδες ζεύγη βάσεων.

Τέλος, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την ύπαρξη άλλων μηχανισμών που μπορεί να συμμετέχουν στη δημιουργία των σύνθετων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, ο TTI μηχανισμός ωστόσο, είναι σίγουρα ένας από αυτούς, ανοίγοντας νέους δρόμους σε αντικαρκινικές θεραπείες που στοχεύουν την τελομερική διατήρηση.

Το δεύτερο βήμα προς την κατανόηση της σχέσης της τελομερικής δυσλειτουργίας και χρωμοσωμικής αστάθειας σε κύτταρα που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό, έγινε μέσω της επαγωγής στρες της αντιγραφής, που αποτελεί ακόμα ένα σημαντικό παράγοντα τροφοδότησης της χρωμοσωμικής αστάθειας (Burrell et al., 2013). Βλάβες στα τελομερικά

άκρα που έχουν προκληθεί από στρες της αντιγραφής, ενεργοποιούν διάφορους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, συμπεριλαμβανομένων του ομόλογου ανασυνδυασμού αλλά και της μη ομόλογης επανένωσης των άκρων (O'Sullivan & Karlseder, 2010). Παρόλα αυτά, κανένας από τους δύο αυτούς μηχανισμούς δεν είναι ικανός να συνθέσει μακριές αλυσίδες τελομερικού DNA και γι' αυτό το λόγο, κανένας δεν είναι κατάλληλος για την επιμήκυνση των τελομερών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή προτείνουμε ότι ο ALT μηχανισμός σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές σχετίζεται με το μηχανισμό BIR. Μοναδική ιδιότητα του BIR αποτελεί η σύνθεση μακρών αλληλουχιών DNA με συντηρητικό τρόπο, γεγονός που επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση του ζυμομύκητα, αφού οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι συνδέονται μεταξύ τους και όχι με το χρωμόσωμα που χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση τους (Saini et al., 2013, Donnianni & Symington, 2013, Wilson et al., 2013). Ο BIR μηχανισμός επιδιόρθωσης αποδεδειγμένα υφίσταται στα θηλαστικά και, όπως και στο ζυμομύκητα, εμπλέκεται τόσο στην επιδιόρθωση αποσυναρμολογημένων δικάλων αντιγραφής, όσο και στην επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων του DNA (DSBs). Στα θηλαστικά, ο BIR εξαρτάται από τη δράση της υπομονάδας PolD3, που αποτελεί ορθόλογη μορφή της Pol32 του ζυμομύκητα, καθώς και από τη δράση της υπομονάδας PolD4 της DNA πολυμεράσης δ (Costantino et al., 2014). Θα μπορούσε λοιπόν να θεωρηθεί πως, όπως και στην περίπτωση του ζυμομύκητα έτσι και στα θηλαστικά, η αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται συντηρητικά. Ωστόσο, η συντηρητική «φύση» της αντιγραφής του DNA, δεν είχε αποδειχθεί πειραματικά.

Η δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ πατρικών και θυγατρικών κλώνων, που εξασφαλίζει η τεχνολογία CO-FISH (Bailey et al., 2010), και η επαναλαμβανόμενη μορφή των ανθρώπινων τελομερικών αλληλουχιών, μας έδωσαν τη δυνατότητα να αναπτύξουμε τη μέθοδο τριπλού FISH μέσω της οποίας αποδείξαμε πως ένα αξιόλογο ποσοστό των τελομερών που κυμαίνεται από 11-17%, ανάλογα με την υπερέκφραση ή όχι της κυκλίνης E, αντιγράφεται συντηρητικά.

Είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται συντηρητικός μηχανισμός αντιγραφής σε ζωντανά κύτταρα (Roumelioti et al., 2016).

Η συσχέτιση του συντηρητικού τρόπου αντιγραφής με τις PolD3 και PolD4 ενισχύει την πρότασή μας πως ο BIR μηχανισμός σχετίζεται με τον ALT, καθώς και οι δύο αυτές

υπομονάδες της PolD είναι απαραίτητες για τον BIR στα ανθρώπινα κύτταρα (Costantino et al., 2014). Η απώλεια έκφρασης των υπομονάδων PolD3 και PolD4, τόσο σε περίπτωση φυσιολογικής αντιγραφής όσο και στην περίπτωση επαγωγής αντιγραφικού στρες, οδήγησαν σε μείωση των φαινομένων συντηρητικής αντιγραφής.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός πως η απώλεια έκφρασης των PolD3 και PolD4, έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του τελομερικού μήκους και την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης φαινομένων σύντηξης μεταξύ των τελομερών, καταδεικνύοντας τη σημασία του BIR μηχανισμού επιδιόρθωσης στη τελομερική ομοιόσταση σε ανθρώπινα, καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη συντηρητικού τρόπου αντιγραφής (Roumelioti et al., 2016), όπως προτάθηκε από τους Donnianni και Symington το 2013 και τους Costantino et al. το 2014. Παράλληλα, η ύπαρξη συντηρητικώς αντιγραφόμενου τελομερικού DNA κυττάρων, που χρησιμοποιούν τον ALT μηχανισμό επιμήκυνσης, εγείρει την πιθανότητα ο ALT μηχανισμός να πραγματοποιείται μέσω του BIR.

Η σύνδεση μεταξύ του ALT μηχανισμού επιμήκυνσης και του BIR μηχανισμού επιδιόρθωσης παρέχει τη δυνατότητα περαιτέρω κατανόησης της έναρξης και εγκαθίδρυσης του ALT μηχανισμού, στους ανθρώπινους καρκίνους. Μελλοντικά, η βαθύτερη κατανόηση των διεργασιών θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών, ενάντια σε εξαιρετικά επιθετικούς καρκίνους, όπως τα οστεοσαρκώματα, που εξαρτώνται από τον ALT μηχανισμό.

Ε. Βιβλιογραφία

- Aguilera A and Gaillard H **(2014)** "Transcription and recombination: when RNA meets DNA" *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(8)
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P **(2002)** "Chapter 5: DNA Replication, Repair, and Recombination" *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science. p. 845
- Amrichova J, Lukasova E, Kozubek S, Kozubek M **(2003)** "Nuclear and territorial topography of chromosome telomeres in human lymphocytes" *Exp Cell Res.* 289: 11-26.
- Bai Y and Symington LS **(1996)** "A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*" *Genes Dev.* 10(16):2025-37
- Baird MD, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D **(2003)** "Extensive allelic variation and ultra short telomeres in senescent human cells" *Nat Genet.* 33: 203-207.
- Bailey SM, Murnane JP **(2006)** "Telomeres, chromosome instability and cancer" *Nucleic Acids Research* 34:8.
- Bailey SM, Williams ES, Cornforth MN, Goodwin EH **(2010)** "Chromosome orientation fluorescence in situ hybridization or strand-specific FISH" *Methods Mol Biol* 659: 173 – 183
- Bhattacharjee S and Nandi S **(2016)** "Choices have consequences: the nexus between DNA repair pathways and genomic instability in cancer" *ClinTransl Med.* 5(1):45
- Blackburn HE **(2002)** "Switching and signaling at the telomere" *Cell* 106: 661-673.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W., and Szostak, J.W. **(2006)** "Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging" *Nat. Med.* 12:1133–1138.
- Blasco A, Lee W, Hande P, Samper E, Lansdorp M, De Pinho A, Greider W **(1997)** "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA" *Cell.* 1997; 91: 25-34.
- Blasco MA **(2005)** "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond" *Nat Rev Genet* 6(8):611-22
- Bolzan A, Bianchi M (2006) "Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations" *Mutat Res.* 612: 189-214.
- Bosco G and Haber JE **(1998)** "Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture" *Genetics* 150(3):1037-47

- Bosco N, de Lange T **(2012)** “A TRF1-controlled common fragile site containing interstitial telomeric sequences” *Chromosoma* 121, 465–474
- Bryan T, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel R **(1995)** “Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity” *EMBO J.* 14: 4240-4248.
- Bryan T and Reddel R **(1997)** “Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells” *Eur J Cancer.* 33(5):767-73
- Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR **(1997)** “The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit” *Hum Mol Genet.* 6: 921-926.
- Burrell R, McClelland S, Endesfelder D, Groth P, Weller M, Shaikh N, et al.**(2013)** “Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability” *Nature* 494:492-496.
- Cahill D, Lengauer C, Yu J, Riggins G, Willson J, Markowitz S, et al.**(1998)** “Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers” *Nature* 392:300-303.
- Cervantes BR, Lundblad V **(2002)** “Mechanisms of chromosome end protection” *Curr Opin Cell Biol.* 14: 351-356.
- Cesare AJ and Griffith JD **(2004)** “Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops” *Mol Cell Biol.* 24(22):9948-57
- Cesare AJ and Reddel RR **(2008)** “Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres” *Mech Ageing Dev* 129(1-2):99-108
- Cesare AJ and Reddel RR **(2010)** “Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications” *Nat Rev Genet.* 11(5):319-30
- Chan SWL and Blackburn EH **(2002)** “New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin” *Oncogene.* 21: 553-563.
- Chen Q, Ijima A, Greider CW **(2001)** “Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events” *Mol Cell Biol.* 21(5):1819-27
- Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE **(2013)** “Repair of double-strand breaks by end joining” *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(5):a012757
- Christodoulidou A, Raftopoulou C, Chiourea M, Papaioannou GK, Hoshiyama H, Wright WE, Shay JW, Gagos S. **(2013)** “The roles of telomerase in the generation of polyploidy during neoplastic cell growth” *Neoplasia.*15:156–168

- Conomos D, Stutz M, Hills M, Neumann A, Bryan T, Reddel R, Pickett H **(2012)** “Variant repeats are interspersed throughout the telomeres and recruit nuclear receptors in ALT cells” *J Cell Biol.* 199(6): 893–906.
- Conomos D, Pickett HA, Reddel RR **(2013)** “Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture” *Front Oncol.* 3:27
- Costantino L, Sotiriou SK, Rantala JK, Magin S, Mladenov E, Helleday T, Haber JE, Iliakis G, Kallioniemi OP, Halazonetis TD **(2014)** “Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells” *Science* 343: 88–9
- Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE **(2005)** “Nonhomologous end joining in yeast” *Annu Rev Genet.* 39:431-51
- Déjardin J, Kingston R **(2009)** “Purification of proteins associated with specific genomic Loci” *Cell.* 136(1):175-86
- de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE **(1990)** “Structure and variability of human chromosome ends” *Mol Cell Biol.*10(2):518-27
- de Lange T (1992) “Human telomeres are attached to the nuclear matrix” *EMBO J.* 11: 717-24.
- de Lange T, Petrini J. A new connection at human telomeres: Association of the Mre11 complex with TRF2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2000; LXV: 265–273.
- de Lange T **(2002)** “Protection of mammalian telomeres” *Oncogene* 21: 532-40
- de Lange, T. **(2004)**. “T-loops and the origin of telomeres” *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5:323–329.
- de Lange T **(2005)** “Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres” *Genes Dev.* 19(18):2100-10
- de Lange T, Lundbland V, Blackburn E **(2006)** 2nd edition, *Telomeres.*
- de Lange T **(2009)** “How telomeres solve the end-protection problem” *Science* 326(5955):948-52
- Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A **(2000)** “DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation” *Nature* 404(6777):510-4
- Donnianni RA and Symington LS **(2013)** “Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis” *Proc Natl Acad Sci USA* 110(33):13475-80

- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR **(2000)** “Telomere maintenance by recombination in human cells” *Nat Genet.* 26(4):447-50
- Dunn B, Szauter P, Pardue ML, Szostak JW **(1984)** “Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination” *Cell* 39(1):191-201
- Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C **(2017)** “Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26(1):3-10
- Espejel S, Franco S, Sgura A, Gae D, Bailey S, Taccioli G, Blasco M **(2002)** “Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance” *EMBO J.* 21(22): 6275–6287.
- Evans R **(1988)** “The steroid and thyroid hormone receptor superfamily” *Science.* 240(4854):889-95.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. **(1995)** “The RNA component of human telomerase” *Science* 269(5228):1236-41
- Formosa T and Alberts BM **(1986)** “DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified *bacteriophage T4* proteins” *Cell* Dec 5;47(5):793-806
- Gagos, S., Irminger-Finger I. **(2005)** “Chromosome instability in neoplasia: chaotic roots to continuous growth” *Biochem Cell Biol. J.* 37(5):1014-33.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, et al. **(2005)** “Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions” *Nature* 434:907-13.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H. **(1985)**. “Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts” *Cell* 43:405-13.
- Greider CW **(1996)** “Telomere length regulation” *Annu Rev Biochem.* 65: 337-365.
- Greider CW **(2016)** “Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model” *Genes Dev.* 30(13):1483-91
- Griffith J, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R, Bianchi A, Moss H, De Lange T **(1999)** “Mammalian telomeres end in a large duplex loop ” *Cell* 97: 503-514.
- Grobelny J, Godwin A, Broccoli D **(2000)** “ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle” *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4577-85

- Halazonetis T, Gorgoulis V, Bartek J **(2008)** “An oncogene-induced DNA damage model for cancer development” *Science*. 319(5868):1352-5
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. **(2011)** “Hallmarks of cancer: the next generation” *Cell* 144, 646–674.
- Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, Robinson MO **(1997)** “Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits” *Genes Dev* 11(23):3109-15
- Harle-Bachor C, Boukamp P **(1996)** “Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes” *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 6476-64781.
- Harley C, Futcher AB, Greider CW **(1990)** “Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts” *Nature* 346: 866–868.
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR **(2002)** “Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells” *Oncogene* 21(4):598-610
- Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AY, Pickett HA, Reddel RR **(2009)** “DNA C-circles are specific and quantifiable markers”
- Hayflick, L. **(1965)** “The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains” *Exp. Cell Res.* 37:614–636.
- Hines WC, Fajardo AM, Joste NE, Bisoffi M, Griffith JK **(2005)** “Quantitative and spatial measurements of telomerase reverse transcriptase expression within normal and malignant human breast tissues” *Mol Cancer Res.* 3: 503-509.
- Hoeijmakers JH **(2001)** “Genome maintenance mechanisms for preventing cancer” *Nature* 411(6835):366-74
- Hunter N and Kleckner N **(2001)** “The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination” *Cell* 106(1):59-70
- Kaufmann WK **(1989)** “Pathways of human cell post-replication repair” *Carcinogenesis*. 10: 1-11.
- Kawanishi S, Oikawa S **(2004)** “Mechanism of telomere shortening by oxidative stress” *Ann NY Acad Sci.*1019: 278–284.
- Kilburn A, Shea M, Sargent R, Wilson J **(2001)** “Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability” *Mol. Cell. Biol.* 21, 126–135.

- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW **(1994)** "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer" *Science* 266(5193):2011-5
- Kraus E, Leung WY, Haber JE **(2001)** "Break-induced replication: a review and an example in budding yeast" *Proc Natl Acad Sci USA* 98(15):8255-62
- Kolquist K, Ellisen L, Counter C, Meyerson M, Tan L, Weinberg R, Haber D, Gerald W **(1998)** "Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues" *Nat Genet.* 19: 182-186.
- Lansdorp M, Verwoerd P, van den Rijke M, Dragowska V, Little T, Dirls W, Raap K, Tanke J **(1996)** "Heterogeneity in telomere length of human chromosomes" *Hum Mol Genet.* 5: 685-691.
- Laudet V **(1997)** "Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor" *J Mol Endocrinol.* 19(3):207-26.
- Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW **(1999)** "RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase" *Genetics* 152(1):143-52
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR **(1997)** "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase" *Science* 276(5312):561-7
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR **(1997)** "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase" *Science* 276(5312):561-7
- Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Munoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L., Seyfang, A. et al. **(2007)** "Telomere lengthening early in development" *Nat. Cell Biol.* 9:1436–1441.
- Llorente B, Smith CE, Symington LS **(2008)** "Break-induced replication: what is it and what is it for?" *Cell Cycle* 7(7):859-64
- Londono-Vallejo AJ, Der Sarkissian H, Cazes L, Thomas G **(2001)** "Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans" *Nucl Acids Res.* 29: 3164-3171.
- Londono-Vallejo AJ **(2004)** "Telomere length heterogeneity and chromosome instability". *Cancer Lett.* 212: 135-144.
- Longhese MP **(2008)** "DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres" *Genes Dev* 22(2):125-40
- Louis E **(2002)** "Are Drosophila telomeres an exception or the rule?" *Genome Biol.* 3(10)

- Lue NF and Yu EY (2016) "Telomere recombination pathways: tales of several unhappy marriages" *Curr Genet.*
- Lundblad V (2002) "Telomere maintenance without telomerase" *Oncogene* 21(4):522-31
- Lundblad V and Blackburn EH (1993) "An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence" *Cell* 73(2):347-60
- Lundblad V and Szostak JW (1989) "A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast" *Cell* 57(4):633-43
- Lydeard J, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE (2007) "Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32" *Nature* 448(7155):820-3
- Ma Y, Lu H, Schwarz K, Lieber MR (2005) "Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model" *Cell Cycle* 4(9):1193-200
- Makarov L, Hirose Y, Langmore P (1997) "Long G-tails at both ends of human chromosomes suggest a C-strand degradation mechanism for telomere shortening". *Cell* 88: 657-666.
- Madigan M, Martinko J, eds. (2006) *Brock Biolog of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall.
- Malkova A, Ivanov EL, Haber JE (1996) "Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication" *Proc Natl Acad Sci USA* 93(14):7131-6
- Malkova A and Ira G (2013) "Break-induced replication: functions and molecular mechanism" *Curr Opin Genet Dev.* 23(3): 271–279.
- Mangelsdorf J, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R (1995) "The nuclear receptor superfamily: the second decade" *Cell.* 83(6):835-9.
- Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM (1998) "Short telomeres on human chromosome 17p" *Nat Genet* 18: 76 – 80
- Marzec P, Armenise C, Pérot G, Roumelioti FM, Basyuk E, Gagos S, Chibon F, Déjardin J (2015) "Nuclear-receptor-mediated telomere insertion leads to genome instability in ALT cancers" *Cell* 2015 160(5):913-27
- McClintock B (1941) "The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*". *Genetics.* 26(2): 234–282.

- McClintock B (1950) "The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize" *Proc Natl Acad Sci U S A* 36(6): 344–355.
- McEachern MJ and Haber JE (2006) "Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast" *Annu Rev Biochem.* 75:111-35
- McEachern JM, Krauskopf A, Blackburn HE (2000) "Telomeres and their control" *Annu Rev Genet.* 34: 331-358.
- Mehta A and Haber JE (2014) "Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair" *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(9):a016428
- Meyne, J., Ratliff, R.L., and Moyzis, R. K. (1989) "Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates" *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7049–7053.
- Min J, Wright W, Shay J (2017) "Alternative Lengthening of Telomeres Mediated by Mitotic DNA Synthesis Engages Break-Induced Replication Processes" *Mol Cell Biol.* 37(20)
- Molenaar C, Wiesmeijer K, Verwoerd NP, Khazen S, Eils R, Tanke HJ, Dirks RW (2003) "Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes" *EMBO J.* 22(24):6631-41
- Moore J, Haber J (1996) "Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks" *Nature* 383(6601):644-6.
- Morrow DM, Connelly C, Hieter P (1997) "Break copy" duplication: a model for chromosome fragment formation in *Saccharomyces cerevisiae*" *Genetics* 147(2):371-82
- Muller HJ (1938) "The remaking of chromosomes" *Collecting Net.* 13: 181-198.
- Muntoni, A., Reddel, R.R. (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol.Genet.* 14:191-6.
- Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF (1994) "Telomere dynamics in an immortal human cell line" *EMBO J.* 13(20):4953-62
- Murnane J (2012) Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res.* 1;730(1-2):28-36.
- Nabetani A and Ishikawa F (2011) "Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells" *J Biochem.* 149(1):5-14

- Nassif N, Penney J, Pal S, Engels WR, Gloor GB **(1994)** “Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair” *Mol Cell Biol.* 14(3):1613-25
- Neil J. Ganem, Susana A. Godinho & David Pellman **(2009)** “A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability” *Nature* 460: 278-282.
- Negritto MC **(2010)** “Repairing Double-Strand DNA Breaks” *Nature Education* 3(9):26
- Neumann, A.A., Watson, C.M., Noble, J.R., Pickett, H.A., Tam, P.P., Reddel, R.R. **(2013)** “Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells” *Genes Dev.* 27:18-23.
- Novac N, Heinzl T **(2004)** “Nuclear receptors: overview and classification” *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 3(4):335-46.
- Olefsky J **(2001)** “Nuclear receptor minireview series” *J Biol Chem.* 276(40):36863-4.
- Olovnikov MA **(1973)** “A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon” *Journal of Theoretical Biology* 41: 181-190.
- O'Sullivan RJ and Karlseder J **(2010)** “Telomeres: protecting chromosomes against genome instability” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(3):171-81
- Pâques F and Haber JE **(1999)** “Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*” *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(2):349-404
- Paull TT and Gellert M **(1998)** “The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks” *Mol Cell.* 1(7):969-79
- Pray, Leslie A. **(2008)** “Transposons: The jumping genes” *Nature Education* 1(1):204.
- Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, et al. **(2004)** “Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability” *Nature* 428:77–81.
- Roschke A, Kirsch I **(2010)** “Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells” *Curr Drug Targets* 11(10):1341-50.
- Roumelioti FM, Sotiriou SK, Katsini V, Chiourea M, Halazonetis TD, Gagos S **(2016)** “Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication” *EMBO Rep.* 17(12):1731-1737
- Saini N, Ramakrishnan S, Elango R, Ayyar S, Zhang Y, Deem A, Ira G, Haber JE, Lobachev KS, Malkova A **(2013)** “Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis” *Nature* 502(7471):389-92








- Sakellariou, D., Chiourea, M., Raftopoulou, C., Gagos, S. **(2013)** “Alternative lengthening of telomeres: recurrent cytogenetic aberrations and chromosome stability under extreme telomere dysfunction” *Neoplasia* 15:1301-13.
- San Filippo J, Sung P, Klein H **(2008)** “Mechanism of eukaryotic homologous recombination” *Annu Rev Biochem.* 77:229-57
- Scheel C, Schaefer KL, Jauch A, Keller M, Wai D, Brinkschmidt C, van Valen F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B, Poremba C. **(2001)** “Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas” *Oncogene.* 20:3835–3844
- Sfeir A and de Lange T **(2012)** “Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem” *Science* 336(6081):593-7
- Shay JW and Bacchetti S **(1997)** “A survey of telomerase activity in human cancer” *Eur J Cancer* (5):787-91
- Shay JW, Wright WE **(2007)** “Hallmarks of telomeres in ageing research” *J Pathol.* 211: 114–123.
- Slatter, T.L., Tan, X., Yuen, Y.C., Gunningham, S., Ma, S.S., Daly, E., Packer, S., Devenish, C., Royds, J.A., Hung, N.A. **(2012)** “The alternative lengthening of telomeres pathway may operate in non-neoplastic human cells” *J. Pathol.* 226:509-18.
- Sotiriou SK, Kamileri I, Lugli N, Evangelou K, Da-Ré C, Huber F, Padayachy L, Tardy S, Nicati NL, Barriot S, Ochs F, Lukas C, Lukas J, Gorgoulis VG, Scapozza L, Halazonetis TD **(2016)** “Mammalian RAD52 Functions in Break-Induced Replication Repair of Collapsed DNA Replication Forks” *Mol Cell* 64(6):1127-1134
- Stansel R, De Lange T, Griffith J **(2000)** “T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3’ telomeric overhang” *EMBO J.* 20: 5532-5540.
- Sugawara N, Ira G, Haber JE **(2001)** “DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair” *Mol. Cell. Biol.* 20: 5300–5309.
- Sugiyama T and Kowalczykowski SC **(2002)** “Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation” *J Biol Chem.* 277(35):31663-72
- Sun W, Nandi S, Osman F, Ahn JS, Jakovleska J, Lorenz A, Whitby MC **(2008)** “The FANCM ortholog Fml1 promotes recombination at stalled replication forks and limits crossing over during DNA double-strand break repair” *Mol Cell* 32(1):118-28

- Sung P, Klein H (2006) "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(10):739-50.
- Syeda AH, Hawkins M, McGlynn P (2014) "Recombination and replication" *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(11):a016550
- Symington LS, Rothstein R, Lisby M (2014) "Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*" *Genetics* 198(3):795-835
- Symington LS (2002) "Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair" *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(4):630-70
- Teng SC and Zakian VA (1999) "Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol Cell Biol.* 19(12):8083-93
- Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA (2000) "Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process" *Mol Cell* 6(4):947-52
- Vollrath D, Davis RW, Connelly C, Hieter P (1988) "Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation" *Proc Natl Acad Sci USA* 85(16):6027-31
- Von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C (1995) "Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? " *Exp Cell Res.*; 220: 186-193.
- Wang X, Ira G, Tercero JA, Holmes A, Diffley J, Haber JE (2004) "Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol Cell Biol* 24:6891-9
- Watson JD (1972) "Origin of Concatemeric T7DNA" *Nature New Biology* 239: 197-201.
- Wellinger RJ and Zakian VA (2012) "Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end" *Genetics* 191(4):1073-105
- Weaver BA, Cleveland DW (2006) "Does aneuploidy cause cancer? " *Curr Opin Cell Biol* 18:658–67.
- Wilson MA, Kwon Y, Xu Y, Chung WH, Chi P, Niu H, Mayle R, Chen X, Malkova A, Sung P, Ira G (2013) "Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration" *Nature* 502(7471):393-6

- Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR **(1999)**
“Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body” *Cancer Res.* 59(17):4175-9

Zakian VA **(1995)** “Telomeres: beginning to understand the end”. *Science* 270: 1601-1607.

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΥΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΔΣΚΛΗΠΙΟΝ,
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 ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, 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 ΝΡ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ 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
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, 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 ΤΟΥΤΕΛΩ.

