



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΒΑΣΙΛΗΣ ΓΟΡΓΟΥΛΗΣ

Ο ρόλος των Cockayne Syndrome πρωτεϊνών στη διασφάλιση της γενωμικής ακεραιότητας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ζωής Σπυροπούλου

Βιολόγου BSc, MSc

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚ.ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΟΤΣΙΝΑΣ

Αθήνα

Ιούνιος 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΒΑΣΙΛΗΣ ΓΟΡΓΟΥΛΗΣ

Ο ρόλος των Cockayne Syndrome πρωτεϊνών στη διασφάλιση της γενωμικής ακεραιότητας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ζωής Σπυροπούλου

Βιολόγου BSc, MSc

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚ.ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΟΤΣΙΝΑΣ

Αθήνα

Ιούνιος 2021

Διδακτορική Διατριβή

Ο ρόλος των Cockayne Syndrome πρωτεϊνών στη διασφάλιση της γενωμικής ακεραιότητας

Τριμελής επιτροπή:

- ❖ **Κοτσίνας Αθανάσιος**, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών
(Επιβλέπων)
Εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- ❖ **Γοργούλης Βασίλης**, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών
Διευθυντής Εργαστηρίου Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- ❖ **Φουστέρη Μαρία**, Ερευνήτρια Β, ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ
Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

Ημερομηνία αιτήσεως: 17/4/2013

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς: 6/2/2014

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16/5/2014

Ημερομηνία κατάθεσης: 15/6/2021

Διδακτορική Διατριβή

Ο ρόλος των Cockayne Syndrome πρωτεϊνών στη διασφάλιση της γενωμικής ακεραιότητας

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:

- ❖ **Πέτρος Π. Σφηκάκης**, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Διευθυντής Παθολογικού Τομέα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών,
Διευθυντής Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής & Μονάδος Ρευματολογίας, Λαϊκό
Νοσοκομείο.

Επταμελής επιτροπή:

- ❖ **Κοτσίνας Αθανάσιος**, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών (Επιβλέπων)

Εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

- ❖ **Γοργούλης Βασίλης**, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Διευθυντής Εργαστηρίου Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

- ❖ **Γεωργακίλας Αλέξανδρος**, Καθηγητής Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και
Φυσικών Επιστημών

Τομέας Φυσικής του Εθνικού και Μετσόβιου Πολυτεχνείου

- ❖ **Ευαγγέλου Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

- ❖ **Χαβάκη Σοφία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

- ❖ **Φουστέρη Μαρία**, Ερευνήτρια Β, ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

- ❖ **Χατζής Παντελής**, Ερευνητής Β, ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ









Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

Διδακτορική Διατριβή

**Ο ρόλος των Cockayne Syndrome πρωτεΐνων στη διασφάλιση της γενωμικής
ακεραιότητας**

Βαθμός: «ΑΡΙΣΤΑ»

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘ
ΔΙ 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 ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. 
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ 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,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 2/2014-σήμερα **Υποψήφια Διδάκτωρ**, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα.
Τίτλος διατριβής: Ο ρόλος των Cockayne Syndrome πρωτεϊνών στη διασφάλιση της γενωμικής ακεραιότητας. Επιβλέπων καθηγητής: Δρ Αθανάσιος Κοτσίνας. Σε συνεργασία με το ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλεμινγκ», Βάρη, Αθήνα, Ελλάδα, Εργαστήριο Δρ Μαρίας Φουστέρη.
- 7/2017 Εκπαιδευτικά Σεμινάρια, «Εισαγωγή στο Ψηφιακό Μάρκετινγκ» και «Επικοινωνία και ΜΜΕ»
- 4/2014 Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Μάρκετινγκ καινοτόμων προϊόντων σε Επιστήμες Υγείας/Ζωής», Health2Market, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
- 10/2011-9/2012 **Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών** στην «**Βιοτεχνολογία, Βιοδιεργασία και Διοίκηση Επιχειρήσεων**», Warwick University, Κόβεντρυ, Ηνωμένο Βασίλειο. Βαθμός: «Διάκριση»
Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: Εμπορευματοποίηση των βλαστοκυττάρων για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, Επιβλέπων καθηγητής: Dr Robert Old
- 9/2006-7/2011 **Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών** στην «**Βιολογία**», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, Βαθμός: «Λίαν Καλώς»
Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: Η επίδραση των μεταγραφικών προσαρμοστών ADA2a/b και GCN5 στις αποκρίσεις του *Arabidopsis Thaliana* σε γιββερελίνες. Επιβλέπων καθηγητής: Δρ Κωνσταντίνος Βλαχονάσιος
- 6/2009-8/2009 **Καλοκαιρινό Σχολείο**, Stanford University, Καλιφόρνια, ΗΠΑ, Βαθμός: «Άριστα»
Μαθήματα: Εισαγωγή στη Βιολογία, Γενετική, Βιοχημεία και Μοριακή Βιολογία
- 6/2006 **Απολυτήριο Λυκείου**, Β' Αρσάκειο Λύκειο Ψυχικού, Αθήνα, Ελλάδα. Βαθμός: «Άριστα»

ΕΠΑΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- 06/2019-σήμερα **Υπεύθυνη προϊόντων** (Product Manager), Τμήμα Αναπνευστικών Προϊόντων, Καρδιολογικών Προϊόντων και Προϊόντων Ειδικής Φροντίδας, Φαρμακευτική Εταιρεία: Menarini Hellas
- 11/2017-06/2019 **Υπεύθυνη προϊόντων** (Jr Product Manager), Τμήμα Αναπνευστικών Προϊόντων και Προϊόντων Ειδικής Φροντίδας, Φαρμακευτική Εταιρεία: Menarini Hellas
- 7/2017-10/2017 **Εκπαιδευόμενη στο Μάρκετινγκ**, Τμήμα Καρδιολογικών Προϊόντων, Φαρμακευτική Εταιρεία: Menarini Hellas

11/2012- 6/2017 **Ερευνήτρια-Υποψήφια Διδάκτωρ**, ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλεμινγκ», Βάρη, Αθήνα, Ελλάδα
4/2011-7/2011 **Εκπαιδευόμενη στην Έρευνα**, (Erasmus πρακτική), Aberystwyth University, Ουαλία, Ηνωμένο Βασίλειο.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) **Spyropoulou Z.**, Konstantopoulos D., Lagarou A., Lavigne M., Fousteri M. SUMO conjugation to CSB protein in response to DNA damage is required for efficient recovery of nascent RNA synthesis. Υπό δημοσίευση
- 2) **Spyropoulou Z.**, Papaspyropoulos A., Lagopati N., Myrianthopoulos V., Georgakilas A.G., Fousteri M., Kotsinas A., Gorgoulis V.G. Cockayne Syndrome Group B (CSB): The Regulatory Framework Governing the Multifunctional Protein and Its Plausible Role in Cancer. *Cells*. 2021; 10 (4): 866.
- 3) Liakos A., Konstantopoulos D., **Spyropoulou Z.**, Lavigne M., Fousteri M. Elucidating the role of active transcription in keeping genome integrity in check (O₀₃) in International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and other Nucleotide Excision Repair Disorders Downing College, University of Cambridge, Cambridge, UK. 20–22 March 2019. *British Journal of Dermatology*. 2019; 180 (6), e216-e233
- 4) Ampatziadis-Michailidis G., **Spyropoulou Z.**, Konstantopoulos D., Lavigne M., El-Khamisy S., Fousteri M. (2016) The role of transcription deregulation in SCAN1 cells. 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, Egmond aan Zee, The Netherlands, April 17-22
- 5) Camargo A., Doonan J.H., Papadopoulou D., **Spyropoulou Z.**, Vlachonasios K., Gay A.P. Objective definition of rosette shape variation using a combined computer vision and data mining approach. *PLoS One*. 2014; 9 (5)
- 6) Carmango A., Gay A., Doonan J., Roberts-Yalland A., Papadopoulou D., **Spyropoulou Z.**, Vlachonasios K., Tsakona M. (2013) Computer vision to analyse rosettes shapes of genetically-diverse *Arabidopsis* plants. SEB 2013 Annual Main Meeting, Valencia, Spain, July 3-6
- 7) **Spyropoulou Z.**, Tsompani D, Kaldis A, Poulios S, Vlachonasios KE (2011) The effect of the histone acetyltransferase GCN5 in gene expression of gibberellin biosynthesis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. 12nd Scientific Conference of Hellenic Botanical Society, Rethymno, Greece, September 29 – October 2
- 8) **Spyropoulou Z.**, Poulios S., Kaldis A. and Vlachonasios K. (2010). The effect of the ADA2A/B and GCN5 transcriptional co-activators on the response of *Arabidopsis thaliana* in gibberellins. 32nd Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences, Karpenisi, May 20-22

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

Αγγλικά: Cambridge Certificate in Advanced English, IELTS: 8/9 (Proficiency Level)
Ιταλικά: Certificato di Conoscenza Della Lingua Italiana. Celi 3 (livello B2)
Γαλλικά: Diplome d'études en Langue Française- DELF (Unité A1, A2, A3, A4), L' Institut Francais

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ:

ECDL Core Certificate

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά:

Τον κο **Αθανάσιο Κοτσίνα**, Επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Ιστολογίας–Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την υποστήριξη και συμβουλευτική του καθ’ όλην τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερω τον ευχαριστώ για την στήριξη και την πολύτιμη βοήθειά του τη στιγμή που το είχα περισσότερο ανάγκη, δηλαδή κατά την ολοκλήρωση του σημαντικού αυτού, για εμένα, έργου.

Τον κο **Βασίλη Γοργούλη**, Καθηγητή-Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας–Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την υποστήριξη του όλα αυτά τα χρόνια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Την κα **Μαρία Φουστέρη**, Ερευνήτρια Β΄ του ΕΚΕΒΕ Αλ. Φλέμινγκ, του Τομέα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να διεξάγω έρευνα υψηλού επιπέδου και να εκπαιδευτώ στις νεότερες τεχνικές στον τομέα αυτό. Επίσης, την ευχαριστώ για την ουσιαστική επίβλεψη και καθοδήγησή της καθ’ όλο το διάστημα που εργαζόμουν στο ΕΚΕΒΕ Αλ. Φλέμινγκ.

Τα μέλη της Επταμελούς μου Επιτροπής: τον κο **Αλέξανδρο Γεωργακίλα**, Καθηγητή Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, του Τομέα Φυσικής του Εθνικού και Μετσόβιου Πολυτεχνείου, τον κο **Κωνσταντίνο Ευαγγέλου**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, την κα **Σοφία Χαβάκη**, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών του Εργαστηρίου Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και τον κο **Παντελή Χατζή**, Ερευνητή Β΄ του ΕΚΕΒΕ Αλ. Φλέμινγκ, του Τομέα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, για τα εποικοδομητικά σχόλια τους και για την βοήθειά τους κατά την ολοκλήρωση της διατριβής.

Τον **Matthieu Lavigne**, για τις πολύτιμες συμβουλές και κατευθύνσεις του, τη βαθιά του αγάπη για την έρευνα και την καλή γνώση των τεχνικών που μου μετέδωσε, για το καλό κλίμα συνεργασίας και για την βιοπληροφορική ανάλυση.

Τον **Δημήτρη Κωνσταντόπουλο** για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε και την πολύτιμη βοήθειά του στην βιοπληροφορική ανάλυση των πειραμάτων. Την παρέα και τις στιγμές γέλιου που μου χάρισε.

Την **Άννα Λαγαρού**, για τη βοήθεια της στην κατασκευή του τριπλού μεταλλάγμα-

τος.

Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φουστέρη: **Τάσο Λιάκο, Κατερίνα Ντάκου, Γιώργο Στέφο, Σμαράγδα Φανουργάκη, Eszter Szantai** για το άψογο κλίμα, την επικοινωνιακή ανταλλαγή ιδεών, τη βοήθεια τους και για τις άπειρες όμορφες στιγμές που θα έχω να θυμάμαι. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον **Γιάννη Αμπατζιάδη** για την στήριξη και τη βοήθειά του, καθώς τις στιγμές που δυσκολεύτηκα κατά τη διάρκεια εκπόνησης του διδακτορικού ήταν δίπλα μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου **την οικογένειά μου...**

Πρωτίστως, ευχαριστώ τον σύντροφο και σύζυγο μου **Χρήστο** γιατί αποτέλεσε και αποτελεί την κινητήρια δύναμή μου. Γιατί, δίπλα του και με τη στήριξή του, νιώθω ότι μπορώ να καταφέρω τα πάντα. Γιατί είναι πάντα στο πλευρό μου, να με ακούει, να με συμβουλεύει, να με αγαπάει... Γιατί τον θαύμαζω για την καλοσύνη του, την υπομονή του και για τις αξίες του και προσπαθώ δίπλα του να εξελίσσομαι και να γίνομαι καλύτερος άνθρωπος. Πάνω απ' όλα τον ευχαριστώ για την κόρη μας **Ειρήνη**... Γιατί ο κόσμος όταν είμαστε οι 3 μας έχει άλλο νόημα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου **Κώστα και Σίσσυ**, για όλα όσα μου έχουν προσφέρει! Για την δίχως όρια αγάπη τους, την αμέριστη φροντίδα τους και τη συνεχή στήριξή τους, για το αίσθημα σιγουριάς και ασφάλειας που μέχρι και τώρα με συντροφεύει... Γιατί από πολύ μικρή με προέτρεψαν να ανακαλύψω τον κόσμο και να βάλω τους υψηλότερους δυνατούς στόχους και εκείνοι ήταν και θα είναι δίπλα μου. Γιατί ο καθένας ξεχωριστά αποτέλεσε πρότυπο και πηγή έμπνευσης και οι δύο τους μαζί, ως γονείς, είναι ότι καλύτερο θα μπορούσε να ευχηθεί ένα παιδί. Γιατί, η αποφασιστικότητα τους, η δυναμικότητα τους, η πολυπραγμοσύνη τους, η εξυπνάδα τους, η ειλικρίνεια τους κι η αγάπη και η φροντίδα που βάζουν σε ότι ασχολούνται ήταν λίγα από τα χαρακτηριστικά τους που μου μεταλαμπάδευσαν και τα οποία αποτέλεσαν βασικά εφόδια για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τον **Αντώνη**, γιατί ως μεγάλος αδερφός ήταν πάντα δίπλα μου για να με εκπαιδεύει να ξεπερνάω κάθε δυσκολία, να στηρίζομαι στις δικές μου δυνάμεις, αλλά ταυτόχρονα ήταν δίπλα μου για να με προστατεύει όταν χρειάζεται (ή ακόμα κι όταν δεν το έκρινα απαραίτητο). Γιατί νιώθω όμορφα γνωρίζοντας ότι είναι υπερήφανος για εμένα που ολοκλήρωσα αυτό το δύσκολο εγχείρημα.

Τέλος, ευχαριστώ τα πεθερικά μου **Γιάννη και Ρένα** για την αμέριστη βοήθειά τους, καθώς και τις φίλες μου **Χριστίνα, Ύρια, Πέννυ, Αντωνία και Μυρτώ** για τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

**Στον σύζυγο μου Χρήστο
& στην κόρη μας Ειρήνη**

Περιεχόμενα

Περίληψη

Εισαγωγή

- I) Μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (NER)
- II) Ασθένειες και σύνδρομα σχετιζόμενα με ελαττωματικό NER μηχανισμό
 - IIA) Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum, XP)
 - IIB) Τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy, TTD)
 - IIΓ) Cockayne Syndrome (CS)
 - Συμπτώματα συνδρόμου Cockayne
 - Συχνότητα εμφάνισης συνδρόμου Cockayne
 - Διάγνωση συνδρόμου Cockayne
 - Θεραπεία συνδρόμου Cockayne
 - Μοριακή αιτιολογία συνδρόμου
 - IIΔ) UV-sensitive syndrome (UV^SS)
 - IIΕ) Cerebro-OCulo-Facio-Skeletal Syndrome (COFS)
- III) CS πρωτεΐνες
 - IIIA) CSA (Cockayne syndrome protein A)
 - IIIB) CSB (Cockayne syndrome protein B)
 - Ρόλοι της CSB πρωτεΐνης
 - Ρυθμιστικό πλαίσιο της CSB πρωτεΐνης
- IV) Η SUMO (Small Ubiquitin Modifier) μετά-μεταφραστική τροποποίηση
- V) Ο ρόλος της SUMOύλίωσης στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA
- VI) Ρύθμιση της μεταγραφής

Σκοπός

Υλικά και μέθοδοι

- I) Κυτταρικές αναλύσεις
 - I1) Κυτταρικές σειρές

- 12) Δημιουργία κυτταρικής σειράς CSB^{ΔSUMO}
- 13) Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας
- 14) Ακτινοβολήση με UV
- 15) Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων
- 16) Έλεγχος ικανότητας δημιουργίας αποικιών
- 17) Κυτταρομετρία ροής
- 18) Πείραμα ανοσοφθορισμού με χρήση του EU (Ethylene Uridine)

αναλόγου

II) Μοριακές αναλύσεις

- II1) Χημική διασύνδεση (Crosslinking)
- II2) Λύση των κυττάρων, απομόνωση πυρηνικού υλικού και κατακερματισμός χρωματίνης (Sonication)
- II3) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin ImmunoPrecipitation, CHIP)
 - II3A) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης για έλεγχο DNA (ChIP PCR, ChIP sequencing, ChIP Dot Blot)
 - II3Ai) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης για έλεγχο DNA με qPCR (ChIP PCR)
 - II3Aii) Κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και αλληλούχιση του DNA (ChIP sequencing)
 - II3Aiii) Ανοσοαποτύπωση κουκκίδας (Dot Blot)
 - II3B) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immuno Precipitation, CHIP) και έλεγχος πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western)
- II4) Κλασματοποίηση των κυττάρων (Cell fractionation)
 - II4α) Μέσω ομογενοποιητή Dounce και χρήση μικροκοκκικής νουκλεάσης
 - II4β) Κλασματοποίηση κυττάρων μέσω ψύξης-απόψυξης
- II5) Συλλογή, επεξεργασία και αλληλούχιση ώριμων PolyA μεταγράφων mRNA (RNA sequencing)

- 116) Συλλογή, επεξεργασία και αλληλούχιση νεοσυντιθέμενων μεταγράφων RNA παρουσία ή απουσία του αναστολέα της επιμήκυνσης της μεταγραφής DRB (preDRB-nascent RNA sequencing)
- 117) Έλεγχος παραμονής του πρόδρομου RNA, παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής DRB 22 ώρες μετά από UV ακτινοβολία.

Αποτελέσματα

Σχεδιασμός Υπόθεσης

Κεφάλαιο 1^ο

Χαρακτηρισμός της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης ως απόκριση σε έκθεση ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV-C)

Διερεύνηση των πιθανών θέσεων της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης και δημιουργία της τριπλά μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης

Έλεγχος της ικανότητας SUMOύλιωσης της τριπλά μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης

Κεφάλαιο 2^ο

Έλεγχος της επίδρασης της έλλειψης της SUMOύλιωσης της CSB πρωτεΐνης στην βιωσιμότητα των κυττάρων και τη δημιουργία αποικιών μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία

Έλεγχος της επίδρασης της έλλειψης της SUMOύλιωσης της CSB πρωτεΐνης στην επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία

Κεφάλαιο 3ο

Ο ρόλος της SUMOύλιωσης της CSB πρωτεΐνης στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ύστερα από έκθεση των κυττάρων σε UV-C ακτινοβολία.

Κεφάλαιο 4ο

Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων πριν και μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας

Κεφάλαιο 5^ο

Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της πρωτεΐνης CSB στη δέσμευση της στην χρωματίνη και στην αλληλεπίδραση της με την RNAPOLII σε σημεία βλαβών DNA.

Κεφάλαιο 6^ο

Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην επιμήκυνση της μεταγραφής μετά από UV ακτινοβολία.

Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

Ευρετήριο Συντμήσεων

Περίληψη

Το σύνδρομο Cockayne (CS) είναι μια σπάνια νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία έχει αιτιολογικώς συσχετιστεί με την ελαττωματική απόκριση των κυττάρων στην παύση της μεταγραφής λόγω ύπαρξης βλάβης. Η υποκείμενη παθοφυσιολογία του CS που συνδέεται με ένα από τα κύρια γονίδια υπεύθυνα για το σύνδρομο CS, το CSB, αποτέλεσε το επίκεντρο έντονης έρευνας, ωστόσο σημαντικές λεπτομέρειες της μοριακής του λειτουργίας παραμένουν άγνωστες. Στη διδακτορική αυτή διατριβή, χαρακτηρίστηκε ο ρόλος της προκαλούμενης από UV ομοιοπολικής τροποποίησης της CSB από τη SUMO 2/3 πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η έρευνα αυτή έδειξε ότι η πολλαπλή SUMOυλίωση του αμινοτελικού άκρου της CSB, ως απόκριση στην ύπαρξη βλάβης στο DNA, λαμβάνει χώρα ταχύτατα. Η ταχύτητα της τροποποίησης συμβάλλει στη διευκόλυνση της ταχείας μεταγραφοεξαρτώμενης επιδιόρθωσης του DNA σε όλο το μεταγραφόμενο γονιδίωμα, η οποία με τη σειρά της θα οδηγήσει στην ορθή επιμήκυνση της μεταγραφής. Επιπροσθέτως, η μελέτη αυτή έδειξε ότι η έκφραση των μεταλλαγμάτων CSB SUMO οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευση μη επεξεργασμένων (πρόδρομων) μορίων RNA πλησίον του 5' άκρου των ενεργών γονιδίων σε μεταγενέστερα χρονικά διαστήματα μετά την ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, βρέθηκε ότι προκαλείται περαιτέρω απορρύθμιση διαφορετικών υποσυνόλων γονιδίων σε πρώιμα και ύστερα χρονικά διαστήματα μετά την ακτινοβόληση. Παραδείγματα από τέτοια υποσύνολα γονιδίων που επηρεάζονται είναι αυτά που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και σε διεργασίες επιδιόρθωσης του DNA, καθιστώντας τα κύτταρα ανίκανα να ολοκληρώσουν τη S φάση του κυτταρικού κύκλου και να επηρεάσουν σοβαρά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα ευρήματά της διδακτορικής αυτής διατριβής αποκαλύπτουν σημαντικές πληροφορίες για το υποκείμενο ρυθμιστικό πλαίσιο του ρόλου της CSB πρωτεΐνης ως απόκριση σε βλάβες στο DNA, που επιτρέπει την ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης και την έγκαιρη ανάκτηση της μεταγραφής, συμβάλλοντας πιθανώς έτσι στην αποφυγή συγκρούσεων των συμπλόκων μεταγραφής και αντιγραφής με επιβλαβείς επιδράσεις στη σταθερότητα του γονιδιώματος και στην επιβίωση κυττάρων.

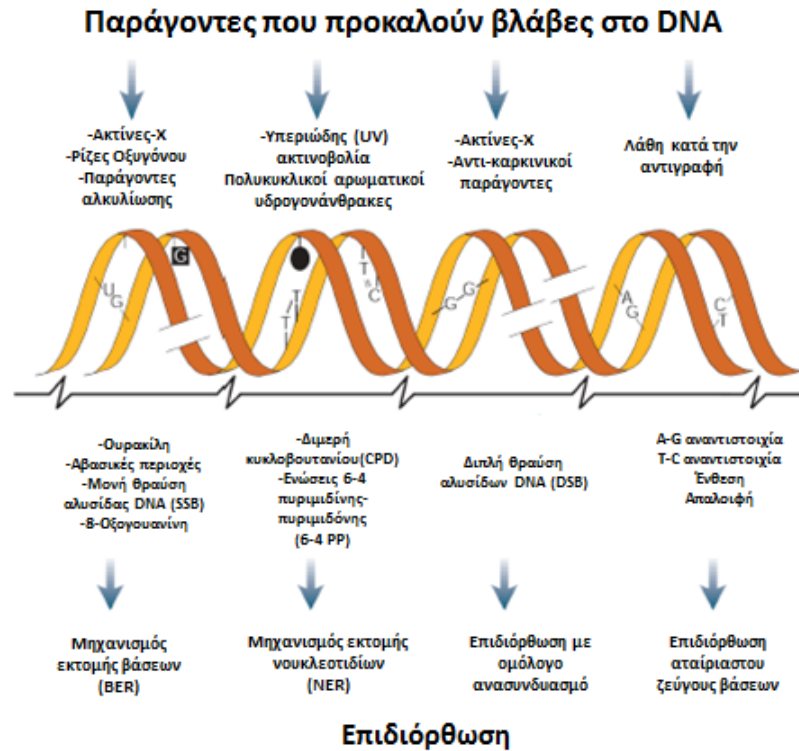
Abstract

Cockayne syndrome (CS) is a rare neurodevelopmental disorder that has been causatively associated with defects in the way cells resolve damage-arrested transcription. The underlying CS pathophysiology linked to one of the main CS causal genes, CSB, has been the focus of intense research, however important details of its molecular function are still unknown. In this thesis, the role of the UV-induced covalent modification of CSB by SUMO 2/3 protein was characterized. In particular it has been shown that multi-SUMOylation of the N-terminus of CSB occurs rapidly in response to DNA damage to facilitate transcription-coupled accelerated repair throughout the transcribed genome, in turn enabling proper resumption of transcription elongation. Furthermore, this study has shown that expression of CSB SUMO mutants results in an increased accumulation of non-processed RNA molecules in close proximity to the 5' end of active genes at late times after UV irradiation. It further causes the deregulation of different subsets of genes at early and late time points such as those involved in cell cycle regulation and DNA repair processes, rendering the cells unable to complete S phase and severely affecting cell viability. The findings of this thesis reveal important insights into the underlying regulatory framework of the role of CSB protein in DNA damage responses allowing completion of repair and prompt recovery of transcription, thus potentially contributing in the avoidance of transcription-replication collisions with detrimental effects for genome stability and survival of the cells.

Εισαγωγή

Το γενετικό υλικό των κυττάρων εμπεριέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την ορθή ανάπτυξη, λειτουργία και αναπαραγωγή του οργανισμού. Η διατήρηση, ωστόσο, της γενωμικής ακεραιότητας αποτελεί καθημερινή πρόκληση για τα ανθρώπινα κύτταρα, καθώς το ανθρώπινο γονιδίωμα απειλείται συνεχώς τόσο από την επίδραση εξωγενών παραγόντων όπως η υπεριώδης (UV) και η ιονίζουσα ακτινοβολία όσο και από ενδογενείς παράγοντες όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ο μειωτικός ανασυνδυασμός. Για να αποτραπούν οι δραματικές συνέπειες των βλαβών του DNA, που περιλαμβάνουν την αναστολή βασικών λειτουργιών του κυττάρου, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο καθώς και την ογκογένεση, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα σύνολο μηχανισμών ανίχνευσης, σηματοδότησης και επιδιόρθωσης των διαφορετικών βλαβών του DNA¹.

Ανάλογα με το είδος της βλάβης που προκύπτει, το κύτταρο επιστρατεύει τον ειδικό για την επιδιόρθωση της βλάβης μηχανισμό (Εικόνα 1). Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός εκτομής βάσεων (Base Excision Repair_BER), επιδιορθώνει μικρές χημικές αλλοιώσεις βάσεων, όπως οι οξειδώσεις, οι μεθυλιώσεις και οι υδρολύσεις, και οι θραύσεις της μίας αλυσίδας του DNA οι οποίες δύναται να προκύψουν από τη λειτουργία του μεταβολισμού (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) καθώς και από την έκθεση των κυττάρων σε ακτίνες χ και σε παράγοντες αλκυλίωσης. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ο μηχανισμός ο οποίος επιδιορθώνει τις θραύσεις και των δύο αλυσίδων του DNA που προκύπτουν από την επίδραση των ακτινών χ καθώς και από την έκθεση του οργανισμού σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που σκοπό έχουν την θεραπεία του καρκίνου όπως η σισπλατίνη (cisplatin_cis-Pt) και η μιτομυκίνη. Οι βλάβες στο DNA που προκύπτουν κατά την αντιγραφή και οδηγούν σε προσθήκη μίας ή λίγων μη συμπληρωματικών βάσεων καθώς και σε προσθήκη επιπρόσθετης ή απάλειψη βάσης, επιδιορθώνονται από τον μηχανισμό αταίριαστου ζεύγους βάσεων (mismatch repair). Τέλος, ο μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair_NER) έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει διαφορετικές δομικά βλάβες, κοινός παρονομαστής των οποίων είναι η πρόκληση από αυτές ογκωδών βασικών πρόσθετων που οδηγούν σε αλλοίωση της δομής της διπλής έλικας του DNA. Παραδείγματα τέτοιων βλαβών αποτελούν τα ογκώδη πρόσθετα που προκύπτουν από έκθεση των κυττάρων σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες καθώς και τα διμερή πυριμιδίων κυκλοβουτανίου (CPD) και τα 6-4 φωτοπροϊόντα πυριμιδίνης πυριμιδόνης (6-4 PPs) που επάγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία του ηλίου^{2 3 4}.



Εικόνα 1. Είδη βλαβών DNA και μηχανισμοί επιδιόρθωσής τους. Τροποποιημένη από ⁵

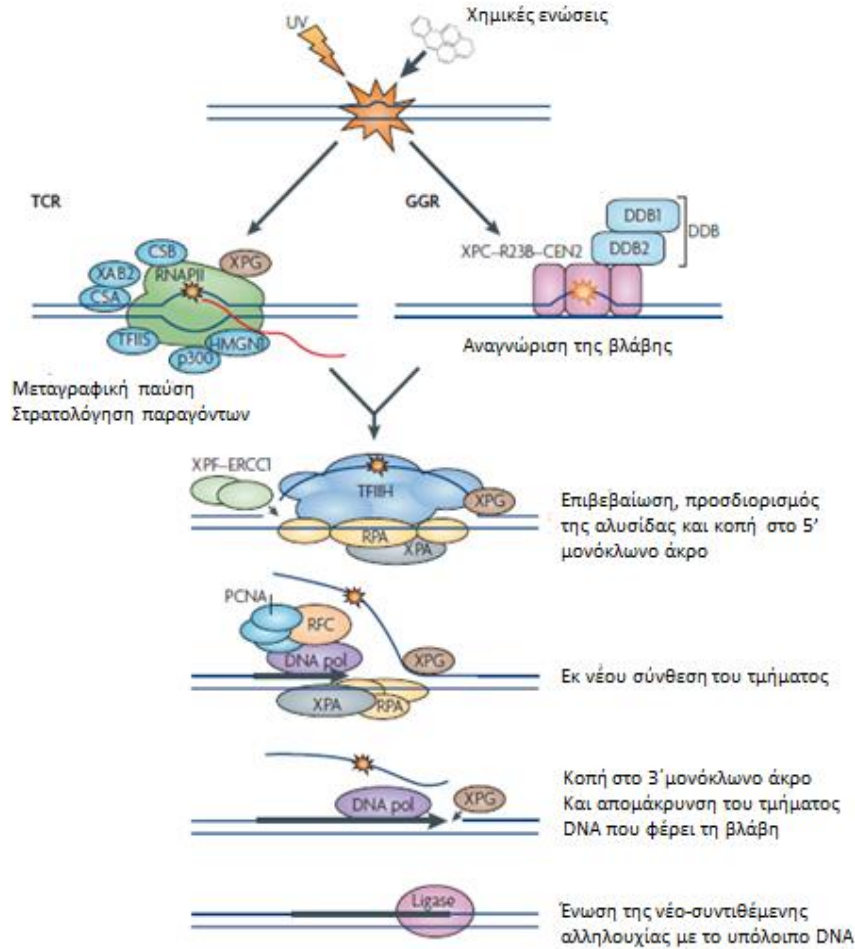
I) Μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (NER)

Η επιδιόρθωση μέσω του NER μονοπατιού απαιτεί την συντονισμένη δράση 20-30 πρωτεϊνών και συνοπτικά περιλαμβάνει τα στάδια της αναγνώρισης της βλάβης και του τοπικού ξετυλίγματος της διπλής έλικας του DNA, της διπλής κοπής στα 3' και 5' άκρα του μονόκλωνου τμήματος του DNA που περιέχει την βλάβη, την εκ νέου σύνθεση του τμήματος με βάση των κανόνων συμπληρωματικότητας, την αφαίρεση του ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει την βλάβη και την ένωση της νέο-συντιθέμενης αλληλουχίας με το υπόλοιπο DNA (Εικόνα 2)⁶.

Ο NER μηχανισμός διακρίνεται σε δύο υπο-μονοπάτια, τα οποία διαφέρουν μόνο στα αρχικά στάδια της αναγνώρισης της βλάβης και της ενεργοποίησης του μηχανισμού. Το πρώτο υπο-μονοπάτι αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία ως Global Genome Repair (GGR ή GG-NER) και περιλαμβάνει την επιδιόρθωση των βλαβών από το όλο το γενωμικό DNA ανεξάρτητα αν μεταγράφεται, ενώ το δεύτερο υπο-μονοπάτι γνωστό ως μηχανισμός της μεταγραφο-εξαρτώμενης επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίου (Transcription-Coupled Repair_TCR ή TC-NER) είναι υπεύθυνο για τη στοχευμένη απομάκρυνση βλαβών από την

αλυσίδα του DNA που μεταγράφεται⁷. Η συντονισμένη δράση των συμπλεγμάτων XPC/RAD23B και DDB1/2 είναι απαραίτητη για την αναγνώριση της βλάβης στο GGR, ενώ η ενεργοποίηση του TCR μονοπατιού επιτυγχάνεται μετά από τη φυσική παρεμπόδιση της RNA πολυμεράσης (RNAPOLII) στο σημείο της βλάβης⁸⁻¹⁰. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης αποκάλυψαν ότι, η ακινητοποιημένη στο σημείο της βλάβης RNAPOLII αλληλεπιδρά με τις σημαντικές για την εμφάνιση του συνδρόμου πρωτεΐνες CSA (Cockayne Syndrome protein A) και CSB (Cockayne Syndrome protein B), καθώς και με τις πρωτεΐνες XAB2 (Xeroderma pigmentosum protein A-Binding protein -2), TFIIIS (Transcription Factor II-S), HMGN1 (High Mobility Group Nucleosome-binding protein 1) και p300¹¹. Η πρωτεΐνη CSB είναι υπεύθυνη για την στρατολόγηση της CSA πρωτεΐνης (περαιτέρω ανάλυση των CS πρωτεϊνών στο κεφάλαιο III)¹². Η πρωτεΐνη XAB2 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη XPA, η οποία είναι απαραίτητη και για τα δύο υπομονοπάτια του NER. Η XAB2 φέρεται να έχει ρόλο τόσο στο TCR όσο και στην μεταγραφή¹³. Επιπροσθέτως, ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIIS φέρει τον κύριο ρόλο της ενεργοποίησης της ιδιότητας της νουκλεάσης της RNAPOLII, η οποία μετά την οπισθοδρόμηση από το σημείο της βλάβης κόβει το νεοσυντιθέμενο μετάγραφο και επιτρέπει έτσι την συνέχιση της μεταγραφής¹⁴. Οι πρωτεΐνες HMGN1 και p300 είναι υπεύθυνες για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά την διάρκεια της επιδιόρθωσης της βλάβης και συγκεκριμένα, η HMGN1 αυξάνει την ακετυλίωση της λυσίνης 14 της ιστόνης H3, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης¹⁵.

Μετά την αναγνώριση της βλάβης, ο μηχανισμός είναι κοινός για τα δύο υπομονοπάτια και αποτελείται από: i) την επιβεβαίωση της βλάβης ως ένα γνήσιο υπόστρωμα του μηχανισμού εκτομής νουκλεοτιδίων, τον προσδιορισμό της αλυσίδας (κωδική/μη κωδική) στην οποία υπάρχει βλάβη μέσω των συμπλοκών XPA-RPA και TFIIH, το τοπικό ξετύλιγμα του DNA γύρω από τη βλάβη από το TFIIH σύμπλοκο και την τομή από το σύμπλοκο ERCC1-XPF στο 5' άκρο του DNA που φέρει τη βλάβη^{16 17,18}, ii) την εκ νέου σύνθεση του τμήματος από τις DNA πολυμεράσες δ/ε και κ παρουσία των πρωτεϊνών PCNA και RFC¹⁹, iii) την τομή στο 3' άκρο της βλάβης από την ενδονουκλεάση XPG και την απομάκρυνση ενός ολιγονουκλεοτιδίου 24- 32 βάσεων που περιέχει τη βλάβη²⁰ και τέλος iv) την ένωση της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας DNA από τη DNA λιγάση I²¹. Η σύνθεση του νεοσυντιθέμενου DNA ξεκινάει πριν από την εκτομή στο 3' άκρο και την απομάκρυνση του DNA που φέρει την βλάβη. Με αυτόν τον τρόπο, ελαχιστοποιείται η έκθεση του μονόκλωνου DNA κατά την διαδικασία της επιδιόρθωσης της βλάβης και βελτιστοποιείται η μετάβαση του NER²².



Εικόνα 2. Αλληλουχία γεγονότων ενεργοποίησης και λειτουργίας του NER μηχανισμού, Τροποποιημένη από ⁶

Κρίνεται σημαντικό να σημειωθεί ότι η επιδιόρθωση των βλαβών μέσω TCR είναι πολύ πιο ταχεία διαδικασία καθώς λαμβάνει χώρα σε διάστημα λεπτών, συγκριτικά με την επιδιόρθωση μέσω GGR που λαμβάνει χώρα σε διάστημα ωρών ²³. Κρίσιμος ρόλος του TCR μηχανισμού φέρεται να είναι η γρήγορη αφαίρεση των βλαβών που παρακωλύουν την ομαλή μετατόπιση της RNAPOLII για την γρήγορη επανάκαμψη της μεταγραφής. Σε περιπτώσεις όπου ο NER μηχανισμός δε λειτουργεί ο μεγάλος αριθμός DNA βλαβών οδηγεί το κύτταρο σε προγραμματισμένο θάνατο μέσω μονοπατιών απόπτωσης ή μέσω σταδιακής μείωσης της μεταγραφής ζωτικής σημασίας γονιδίων με αποτέλεσμα την αστάθεια του γονιδιώματος.

Η βιολογική σημασία του NER μηχανισμού απεικονίζεται σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια που συμμετέχουν στον μηχανισμό NER και πάσχουν από εγγενείς παθήσεις και σύνδρομα πρόωρης γήρανσης και φωτοευαισθησίας όπως η Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum_XP), η Τριχοθειοδυστροφία (TTD),

το σύνδρομο Cockayne (CS), το σύνδρομο UV^SS και το COFS (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Αντιστοίχιση NER σχετιζόμενων γονιδίων με τον κλινικό φαινότυπο												
Φαινότυποι	Σύνδρομο Cockayne		Τριχοθειο-δυστροφία (TTD)		Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (XP)							
	CSA	CSB	TTDA	TTDN1	XPA	XPB	XPC	XPD	XPE (DDB2)	XPF	XPG	XPV (PoIH)
CS τύπου I,II,II	+	+										
COFS		+						+			+	
XP/CS						+		+			+	
TTD			+	+		+		+				
XP/TTD								+				
XP-με νευρολογικά συμπτώματα					+	+		+		+	+	
XP με δερματοπάθεια					+	+	+	+	+	+	+	+

Τροποποιημένη από ²³. Με κόκκινο σημειώνονται τα κυριότερα για το σύνδρομο γονίδια.

II) Ασθένειες και σύνδρομα σχετιζόμενα με ελαττωματικό NER μηχανισμό

IIA) Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum, XP)

Η Μελαγχρωματική Ξηροδερμία είναι μια σπάνια ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Κύρια χαρακτηριστικά της αποτελούν η αυξημένη φωτοευαισθησία και η αιφνίδια εκδήλωση ερυθήματος, πομφολύγων, μελαγχρωματικών κηλίδων, υποχρωμικών εξανθημάτων και τελαγγειεκτασίας ύστερα από έκθεση σε UV ακτινοβολία από τα πρώτα 2 χρόνια της ζωής του ασθενή. Η εμφάνιση εφηλίδων και άλλων μελαγχρωματικών βλαβών σε φωτοεκτεθειμένες περιοχές του σώματος αποτελεί βασικό κλινικό δείκτη για την διάγνωση των ασθενών σε βρεφική ηλικία²⁴. Οι ασθενείς με XP χωρίς την απαραίτητη προφύλαξη από τον ήλιο, εμφανίζουν φλόγωση της μεμβράνης των βλεφάρων, κερατίτιδα και καρκίνο του δέρματος ήδη από την πρώτη δεκαετία της ζωής τους. Μάλιστα, έρευνα των Kraemer και συνεργατών έχει δείξει ότι οι ασθενείς με XP

εμφανίζουν 10000 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος (όχι μελάνωμα) και 2000 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μελανώματος πριν την ηλικία των 20 ετών²⁵. Οι ασθενείς με XP φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG, XPV. Αξίζει να επισημανθεί ότι οι ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια XPA, XPB, XPD, XPF και XPG, στους οποίους επηρεάζονται αρνητικά και τα δύο υπομονοπάτια του NER, φέρουν επιπρόσθετα χαρακτηριστικά νευροεκφυλισμού, απώλειας ακοής, τετραπληγίας κ.α.

IIΒ) Τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy, TTD)

Η Τριχοθειοδυστροφία αποτελεί σπάνιο νόσημα το οποίο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση στον ασθενή εύθρυπτων τριχών με χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο και χαρακτηριστική εικόνα κατά την εξέταση σε πολωμένο φως. Κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις των TTDA, TTDN1, XPB και XPD και γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Επιπρόσθετα συμπτώματα της νόσου αποτελούν η φωτοευαισθησία, η ιχθύωση, η στειρότητα, η νοητική υστέρηση και η μειωμένη ανάπτυξη^{1,24}.

IIIΓ) Cockayne Syndrome (CS)

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάζεται στην μελέτη του Cockayne Syndrome, ενός σπάνιου γενετικού συνδρόμου που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Το σύνδρομο Cockayne περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1936 από τον Άγγλο E.A. Cockayne, ο οποίος μελέτησε συστηματικά τα χαρακτηριστικά δύο αδερφών με καχεκτικό νανισμό, αμφιβληστροειδοπάθεια και κώφωση.

-Συμπτώματα συνδρόμου Cockayne

Οι ασθενείς με CS, παρόλο που παρουσιάζουν φυσιολογικό φαινότυπο κατά την γέννηση, σύντομα κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής τους παρουσιάζουν πληθώρα κλινικών συμπτωμάτων, κυριότερα εκ των οποίων είναι: η καχεξία, ο νανισμός, τα αφέστωτα ώτα, η χαρακτηριστική βυθισμένη όψη των οφθαλμών, η μεταγεννητική δυσλειτουργική ανάπτυξη του εγκεφάλου, η μειωμένη ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος, ο νευροεκφυλισμός, η απώλεια της ακοής και της όρασης, η δυσκολία κατάποσης που οδηγεί

στην ανάγκη πρόσληψης τροφής με την βοήθεια γαστρικού σωλήνα και τέλος ο πρόωρος θάνατος με μέσο όρο ζωής τα 12 έτη²⁴ (Εικόνα 3). Σε αντίθεση με τους ασθενείς με XR, οι ασθενείς με CS δεν εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου και αυτό συμβαίνει πιθανώς λόγω της αυξημένης ενεργοποίησης των αποπτωτικών μονοπατιών²⁶ καθώς και λόγω της απουσίας μεταλλαξιγένεσης από έκθεση σε UV ακτινοβολία²⁷.

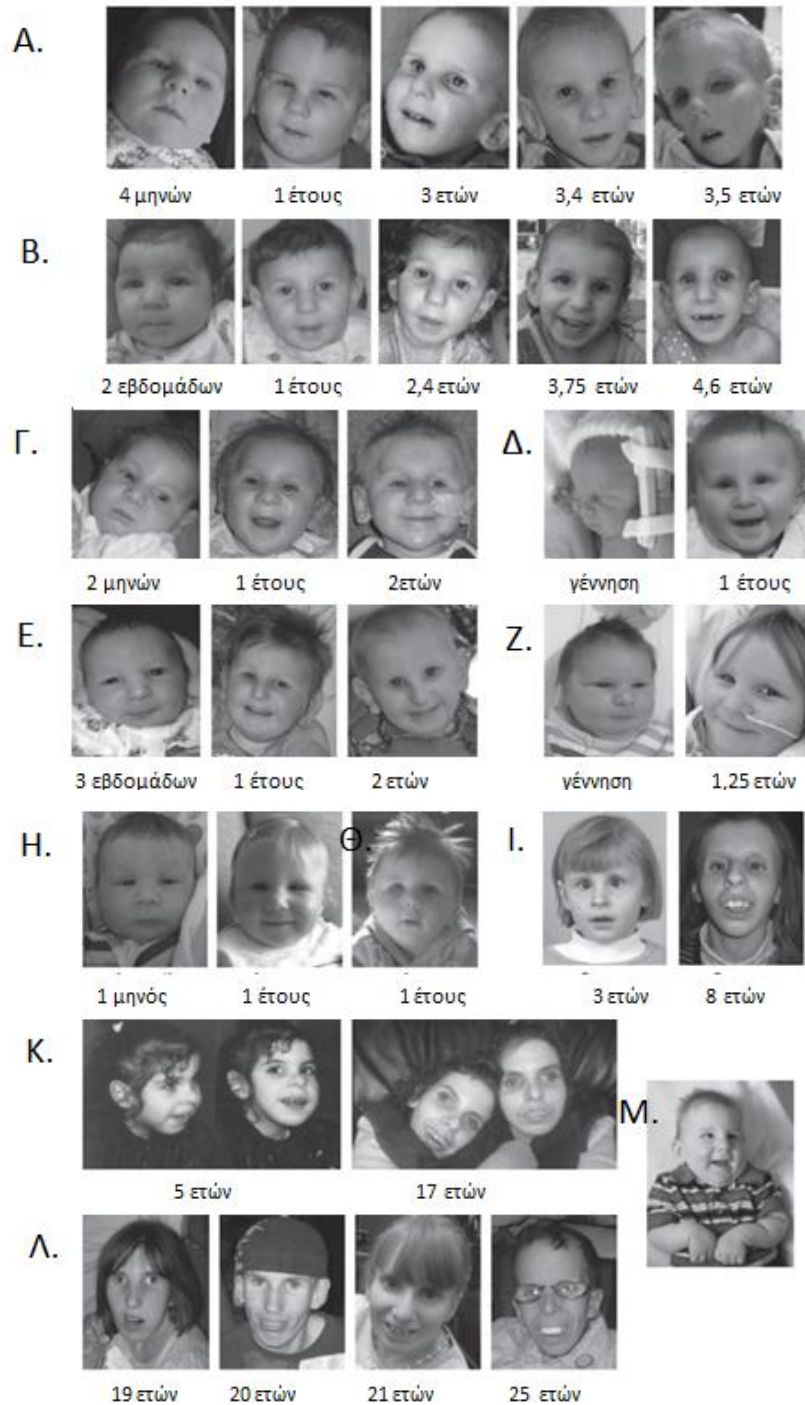
-Συχνότητα εμφάνισης συνδρόμου Cockayne

Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου στην Δυτική Ευρώπη εκτιμάται σε 2,7 άτομα ανά ένα εκατομμύριο γεννήσεις (1 άτομο ανα 370000 γεννήσεις), ωστόσο τα ποσοστά αυτά πιθανώς να είναι αρκετά υψηλότερα λόγω δυσκολιών στην επίτευξη έγκυρης διάγνωσης²⁸. Μάλιστα, υπάρχουν παραδείγματα περιοχών, όπως είναι οι γενετικά απομομωμένες κοινότητες του Ισρήλ, που εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά συχνότητας φορέα (1:15)^{29 30}.

-Διάγνωση συνδρόμου Cockayne

Ανάλογα με τη σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων καθώς και την χρονική περίοδο εμφάνισης του (σε νεογνική ή βρεφική ηλικία), το σύνδρομο Cockayne έχει διακριθεί σε 3 υποκατηγορίες: CS τύπου I: ασθενείς που φέρουν τα κλασσικά συμπτώματα του συνδρόμου, τα οποία δεν είναι εμφανή κατά την γέννηση αλλά αναπτύσσονται μετά τα πρώτα χρόνια της ζωής των ασθενών, CS τύπου II: ασθενείς που εμφανίζουν πιο σοβαρά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, τα οποία είναι διακριτά αμέσως μετά την γέννηση και τα οποία οδηγούν σε καθυστέρηση της ανάπτυξης και πρόωρο θάνατο των ασθενών άμεσα κατά την πρώτη δεκαετία της ζωής τους και CS τύπου III: ασθενείς με ηπιότερη κλινική εικόνα των χαρακτηριστικών του συνδρόμου και οι οποίοι έχουν προσδόκιμο επιβίωσης άνω των 30 χρόνων. Είναι χρήσιμο εντούτοις να τονισθεί ότι η διάκριση αυτή, καθώς δεν μπορεί να έχει σαφή όρια λόγω του ευρέου φάσματος των κλινικών συμπτωμάτων, έχει πολλούς επικριτές.

Ύστερα από εκτενή μελέτη 140 κλινικών περιπτώσεων, έχουν προταθεί επίσημα κλινικά κριτήρια για την διάγνωση των ασθενών με την κλασική μορφή του συνδρόμου, CS τύπου I (Πίνακας 2)³¹. Συγκεκριμένα, CS τύπου I ασθενείς διαγιγνώσκονται σε παιδική ηλικία όταν πληρούν τα δύο κύρια κριτήρια και τρία από τα δευτερεύοντα κριτήρια, ενώ σε



Εικόνα 3 Φωτογραφίες ατόμων με CS. Κάποιοι από τους ασθενείς φαίνονται απολύτως φυσιολογικοί στα πρώτα 1-2 χρόνια της ζωής τους, ενώ άλλοι εμφανίζουν ανεπαίσθητες ενδείξεις για διάγνωση. Οι ασθενείς που απεικονίζονται στις φωτογραφίες Α., Β. και Κ. επιδεικνύουν χαρακτηριστικά απώλειας υποδόριου λίπους και βυθισμένους σε εμφάνιση οφθαλμούς. Οι ασθενείς στις φωτογραφίες Η. και Θ. είναι αδέρφια ενώ οι ασθενείς στην φωτογραφία Κ. είναι πανομοιότυπα δίδυμα αδέρφια. Μεγαλύτερα ηλικιακά άτομα απεικονίζονται στην φωτογραφία Λ. Τέλος, στην φωτογραφία Μ., απεικονίζεται η χαρακτηριστική κάμψη των άνω άκρων που εμφανίζουν οι ασθενείς με CS. Τροποποιημένη εικόνα από ³²

νηπιακή ηλικία διαγιγνώσκονται ασθενείς οι οποίοι πληρούν τα δύο κύρια κριτήρια και ταυτοχρόνως εμφανίζουν δερματική φωτοευαισθησία^{31 33}. Μολαταύτα, κρίνεται σημαντικό να αναφερθεί ότι η επιβεβαίωση της διάγνωσης, με τη χρήση ειδικών μοριακών γενετικών τεστ ή μεθόδων επιδόρθωσης DNA και επανακαμψης της σύνθεσης RNA, είναι απαραίτητη.

Πίνακας 2. Κριτήρια Διάγνωσης συνδρόμου Cockayne	
Κύρια κριτήρια	Δευτερεύοντα κριτήρια
μειωμένη σωματική ανάπτυξη	Δερματική φωτοευαισθησία, με ή χωρίς λεπτό ή ξηρό δέρμα ή μαλλιά (~ 75%)
προοδευτική μικροκεφαλία και νευρολογική δυσλειτουργία που εκδηλώνεται ως αναπτυξιακή υστέρηση στα περισσότερα άτομα και η οποία ακολουθείται από προοδευτική συμπεριφορική και πνευματική υστέρηση. Η μαγνητική εγκεφάλου αποκαλύπτει Λευκοδυστροφία ^{34 35} Παρουσία ενδοκρανιακών αποτιτανώσεων	Απομυελινωτική περιφερική νευροπάθεια
	μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (~ 55%) και / ή καταρράκτη (~ 36%)
	νευροαισθητήρια απώλεια ακοής (~ 60%)
	Οδοντικές ανωμαλίες: οδοντική τερηδόνα (~ 86%), υποπλασία της αδαμαντίνης, ανωμαλίες του αριθμού των δοντιών και ανωμαλίες του μεγέθους και του σχήματος των δοντιών
	«καχεκτικός νανισμός» με λέπτυνση του δέρματος και των μαλλιών, βυθισμένα μάτια, και κύφωση
	Χαρακτηριστικά ακτινολογικά ευρήματα πάχυνσης του κρανίου, ανωμαλίες της σπονδυλικής στήλης και της πυέλου

Πίνακας τροποποιημένος από³³

-Θεραπεία συνδρόμου Cockayne

Έως τώρα δεν υπάρχει διαθέσιμη φαρμακευτική αγωγή που να θεραπεύει το σύνδρομο Cockayne, ωστόσο στο παρελθόν υπήρξε ένα προϊόν σε φάση κλινικών μελετών, το οποίο στόχευε στην καθυστέρηση της εξέλιξης του συνδρόμου. Πιο αναλυτικά, η

φαρμακευτική ουσία με την εμπορική ονομασία Prodarsan® (με συνδυαστική δράση μαννιτόλης και προλίνης) της εταιρείας DNage BV, έδωσε ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες σε ποντίκια και αφότου ελέγχθηκε ως προς την φαρμακοκινητική και ασφάλεια σε υγιή άτομα, πήρε άδεια από τον FDA (Food and Drug Administration) για την έναρξη κλινικής έρευνας με χορήγηση του φαρμάκου σε ασθενείς. Παρ'ολ' αυτά, η έρευνα τερματίστηκε πρόωρα λόγω απόσυρσης της χρηματοδότησης από τη χορηγό εταιρεία³⁶.

Έτσι, η θεραπεία που προτείνεται μέχρι και σήμερα είναι συμπτωματική και υποστηρικτική και περιλαμβάνει όπου απαιτείται: φυσιοθεραπείες για τη διατήρηση της βάδισης, παρακολούθηση εξατομικευμένων εκπαιδευτικών προγραμμάτων για την αναπτυξιακή και νοητική υστέρηση, τοποθέτηση του σωλήνα γαστροστομίας, χορήγηση φαρμάκων για την καταπολέμηση της σπαστικότητας και του τρόμου (καθημερινή χορήγηση 25 mg καρβιντόπα και 100 mg λεβοντόπα έχει βρεθεί ότι βελτιώνει τον τρόπο ασθενών με CS III³⁷), αντηλιακή προστασία και τέλος θεραπεία της απώλειας ακοής, του καταρράκτη, και άλλων οφθαλμολογικών περιπλοκών όπως στο γενικό πληθυσμό³³.

-Μοριακή αιτιολογία συνδρόμου

Σε κυτταρικό επίπεδο, λόγω του ελαττωματικού μηχανισμού TCR, τα κύτταρα ασθενών με CS εμφανίζουν υπερευαισθησία στην ακτινοβολία UV και μειωμένη επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία³⁸⁻⁴⁰. Υπεύθυνες για την εμφάνιση του CS συνδρόμου είναι κυρίως μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες CSA (Cockayne syndrome A) και CSB (Cockayne Syndrome B), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και την στρατολόγηση NER παραγόντων στην περιοχή της βλάβης¹¹. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη CSA είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του συνδρόμου σε 20% των ασθενών που μελετήθηκαν, ενώ η CSB πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση του συνδρόμου στην πλειονότητα των ασθενών⁴¹. Τέλος, ένα μικρό ποσοστό ασθενών, παρουσιάζει ένα ενδιάμεσο XP/CS φαινότυπο και φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια XPB, XPD και XPG.

IIΔ) UV-sensitive syndrome (UV^SS)

Ελαττωματικό TCR μηχανισμό παρουσιάζουν και οι ασθενείς με το αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο υπερευαισθησίας στην UV (UVSS), συμπτώματα του οποίου αποτελούν η δερματική φωτοευαισθησία και η δημιουργία εφηλίδων και ήπιων αποχρωματισμένων κηλίδων στο δέρμα. Το σύνδρομο οφείλεται σε μεταλλάξεις των

γονιδίων CSA, CSB, και UVSSA (UV-stimulated scaffold protein A). Έχει μάλιστα βρεθεί ότι, η στρατολόγηση της πρωτεΐνης UVSSA στην χρωματίνη είναι CSA-εξαρτώμενη και ρόλοι της είναι η αλληλεπίδραση της με την RNA πολυμεράση στα σημεία της βλάβης και η USP7-εξαρτώμενη σταθεροποίηση της CSB πρωτεΐνης μετά από UV ακτινοβολία (καθώς απουσία αυτής, η CSB πολυ-ουβικτινιώνεται και αποικοδομείται ταχύτερα από το 26S πρωτεάσωμα)⁴². Η σημασία της από-ουβικτινίωσης της CSB από την UVSSA πρωτεΐνη για την σωστή λειτουργία του TCR μονοπατιού έχει αναδειχθεί καθώς μελέτες υπερέκφρασης της CSB πρωτεΐνης σε κύτταρα στα οποία απουσίαζε η πρωτεΐνη UVSSA δεν κατάφερε να κάνει λειτουργικό το TCR μονοπάτι⁴². Αξίζει να τονισθεί ότι οι ασθενείς με UVSS, παρόλο που εμφανίζουν παρόμοιες κυτταρικές και βιοχημικές αποκρίσεις με το σύνδρομο Cockayne, ωστόσο παρουσιάζουν ηπιότερη συμπτωματολογία καθώς δεν εμφανίζουν χαρακτηριστικά νευροεκφυλισμού ή γήρανσης⁴³. Έχει προταθεί λοιπόν ότι, υπεύθυνη για την διαφορετική συμπτωματολογία των συνδρόμων UVSS και CS, είναι η ανεπάρκεια επιδιόρθωσης των οξειδωτικών βλαβών βάσεων σε ασθενείς με CS⁴⁴.

II E) Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome (COFS)

Ένα ακόμα σύνδρομο, το οποίο οφείλεται σε ελαττωματικό TCR μηχανισμό, είναι το σύνδρομο COFS. Πρόκειται για ένα ταχέως εξελισσόμενο νευρολογικό σύνδρομο, το οποίο κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και το οποίο χαρακτηρίζεται από ατροφία εγκεφάλου με παρουσία αποτιτανώσεων, εμφάνιση καταρράκτη, αρθρογρύπωση, οπτική ατροφία, προοδευτική σύσπαση των αρθρώσεων, μειωμένη ανάπτυξη και πρόωρο θάνατο μέχρι την ηλικία των πέντε (5) ετών. Υπεύθυνα γονίδια για την εμφάνιση του συνδρόμου είναι τα ERCC1⁴⁵, ERCC2 (που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη XPD)⁴⁶, ERCC5 (το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη XPG)⁴⁷, και το ERCC6 (το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη CSB)⁴⁸. Αν και με πιο σοβαρή συμπτωματολογία, σε αρκετές περιπτώσεις, ασθενείς που εμφανίζουν τα συμπτώματα του συνδρόμου COFS, διαγιγνώσκονται ως ασθενείς με CS τύπου II⁴⁹.

III) CS πρωτεΐνες

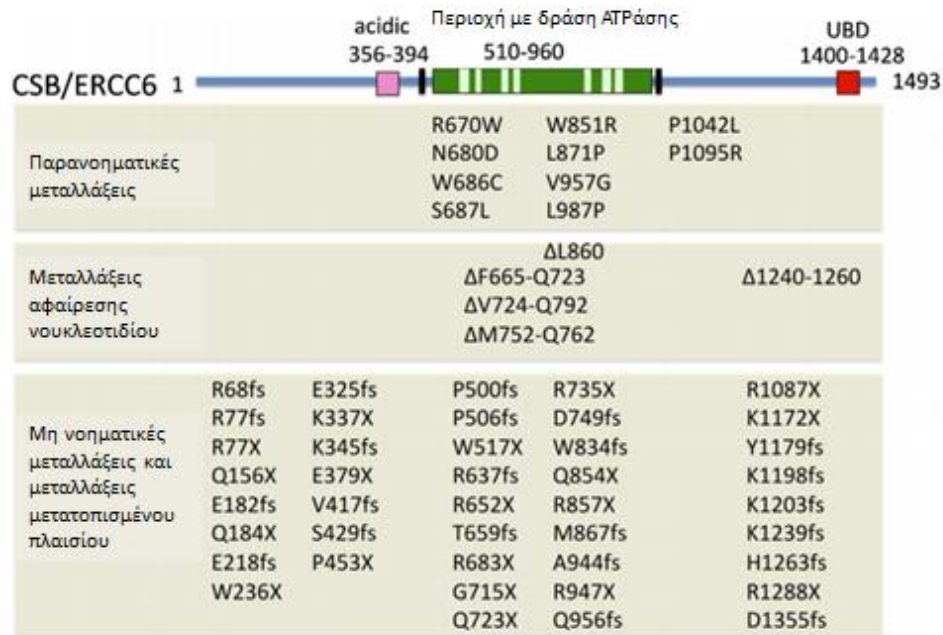
III A) CSA

Η CSA είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 44kDA, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο ERCC8 (Excision Repair Cross-Complementing group 8). Το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο χρωμόσωμα πέντε και είναι οργανωμένο σε δώδεκα εξόνια. Η CSA πρωτεΐνη αποτελείται

από επτά WD40 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες⁵⁰, οι οποίες της δίνουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες όπως η CSB, η p44 υπομονάδα του βασικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIH, η XAB2, η DDB1 και η UVSSA⁵¹. Η CSA, σε σύμπλοκο με τη DDB1 πρωτεΐνη, την Cullin4a και τις ROC1/RBX1 πρωτεΐνες, αποτελεί μέρος μιας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (E3 ubiquitin ligase) και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των πρωτεϊνών στόχων που θα ουβικιτινωθούν⁵². Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύντομα μετά από έκθεση των κυττάρων σε UV ακτινοβολία, το COP9 σιγκναλώσωμα (CSN) αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο CSA-DDB1-Cul4A-Roc1 (CRL4^{CSA}) από-νευλιώνοντας την Cul4A και καθιστώντας έτσι το σύμπλοκο ανενεργό κατά την διάρκεια της επιδιόρθωσης των βλαβών μέσω TCR⁵².

III B) CSB

Το γονίδιο ERCC6 (Excision Repair Cross-Complementation group 6), έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα δέκα και κωδικοποιεί την CSB πρωτεΐνη μεγέθους 168 kDA⁵³. Πρόκειται για μία SWI/SNF ATPάση, εξαρτώμενη από το DNA, με συντηρημένο μοτίβο ελικάσης^{54,55}. Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της ίδιας οικογένειας, έτσι και η CSB δεν έχει βρεθεί να έχει δραστηριότητα ελικάσης, ενώ *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι έχει δραστηριότητα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης^{56,57}. Η CSB πρωτεΐνη αποτελείται από 1493 αμινοξέα και μπορεί να χωριστεί σε τρία διακριτά τμήματα: το αμινοτελικό άκρο, το καρβόξυτελικό άκρο και τη κεντρική περιοχή με δράση ATPάσης (ATPase domain). Στο αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται περιοχή πλούσια σε όξινα αμινοξέα, η λειτουργία της οποίας δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί^{53,58}, ενώ στο καρβόξυτελικό άκρο έχει αναγνωριστεί περιοχή δέσμευσης της ουβικιτίνης (ubiquitin binding domain)⁵⁹. Τέλος, υπάρχουν σήματα πυρηνικού εντοπισμού εκατέρωθεν της κεντρικής ATPάσης περιοχής. Γενετικές μελέτες ατόμων με CS ανέδειξαν πληθώρα μεταλλάξεων της CSB πρωτεΐνης (Εικόνα 4), οι οποίες περιλαμβάνουν παρανοηματικές (missense mutations) μεταλλάξεις που εντοπίζονται κυρίως στην κεντρική περιοχή της CSB, μεταλλάξεις αφαίρεσης νουκλεοτιδίου (deletions), μη νοηματικές μεταλλάξεις (nonsense mutations, stop codon mutations) και μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου (frame shift mutations)⁶⁰⁻⁶⁴.



Εικόνα 4. Απεικόνιση της CSB πρωτεΐνης και των μεταλλάξεων που έχουν χαρακτηριστεί. Τροποποιημένη από 65

- Ρόλοι της CSB πρωτεΐνης

Πολλαπλοί ρόλοι έχουν αποδοθεί στην CSB πρωτεΐνη. Κατ'αρχάς, έχει βρεθεί ότι η CSB πρωτεΐνη ενεργεί στα πρώτα στάδια αναγνώρισης των βλαβών του DNA που παρεμποδίζουν την πορεία της RNAPOLII. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες η CSB αλληλεπιδρά παροδικά με την RNAPOLII, η αλληλεπίδραση αυτή σταθεροποιείται ύστερα από πρόκληση βλαβών στο DNA και παρατεταμένη αναστολή της RNAPOLII στο σημείο της βλάβης⁶⁶. Επιπλέον, η CSB θεωρείται υπεύθυνη για την επιστράτευση NER παραγόντων, τροποποιητών της χρωματίνης όπως η ακετυλοτρανσφεράση ιστονών p300 και η HMGN1 καθώς και βασικών NER παραγόντων όπως ο TFIIH, ο XPG, ο XPA, ο RPA και ο XPF/ERCC1¹¹. Είναι τέλος, απαραίτητη για την προσέλκυση του συμπλέγματος της CSA/DDB1-Cul4A E3 λιγάσης.

Εκτός από τον ρόλο της CSB στο μηχανισμό TCR, η CSB φέρεται να παίζει και άλλους σημαντικούς ρόλους στο κύτταρο, μερικοί εκ των οποίων είναι ο υβριδισμός συμπληρωματικού μονόκλωνου DNA με υψηλή απόδοση και η δραστηριότητα επιχιασμού αλυσίδας DNA (strand exchange)⁶⁷, η αναδόμηση των νουκλεοσωμάτων⁶⁸, η ενίσχυση της αλληλεπίδρασης της p53 πρωτεΐνης με την χρωματίνη καθώς και η αύξηση της ουβικιτινίωσης της p53^{69,70}, η συμμετοχή στον μηχανισμό εκτομής βάσεων⁷¹ και η

συμμετοχή στην επιδιόρθωση των βλαβών στο μιτοχονδριακό DNA με σκοπό την προστασία από τη απώλεια υποδόριου λίπους (που αποτελεί χαρακτηριστικό γήρανσης) σε ποντίκια^{68,72,73}. Επιπροσθέτως, σημαντικός φέρεται είναι ο ρόλος της CSB πρωτεΐνης στην επανεκίνηση της μεταγραφής από την RNAPOLII μετά από βλάβες σε γονίδια βασικής κυτταρικής λειτουργίας (housekeeping genes)⁷⁴.

-Ρυθμιστικό πλαίσιο της CSB πρωτεΐνης

Οι πολλαπλοί αυτοί ρόλοι της CSB πρωτεΐνης οδήγησαν στην ιδέα ύπαρξης ενός πολύπλοκου και αξιόπιστου μηχανισμού ρύθμισης της CSB, ο οποίος θα λειτουργεί πρωτίστως σε καταστάσεις γενετοξικού στρες. Μάλιστα, εμπειριστατωμένη μελέτη των Lake και συνεργατών ανέδειξε την ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού αυτορύθμισης της CSB πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά, μελέτες με μεταλλάγματα στελέχη της CSB πρωτεΐνης απέδειξαν ότι η κεντρική περιοχή της CSB, με δράση ATPάσης, και το καρβοξυτελικό της άκρο είναι απαραίτητα για την σταθερή σύνδεση της CSB στη χρωματίνη ύστερα από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Από την άλλη πλευρά, το αμινοτελικό (N) άκρο της CSB φέρεται να είναι υπεύθυνο για την ειδικότητα της δέσμησης του καρβοξυτελικού άκρου με τη χρωματίνη και να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της δέσμησης αυτής υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αντιθέτως, σε καταστάσεις γενετοξικού στρες, η αρνητική ρύθμιση του N άκρου αναστέλλεται. Η αναστολή αυτή, η οποία για να επιτευχθεί απαιτεί ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP, έχει υποτεθεί ότι συνοδεύεται με αλλαγή της στεροχημικής διάταξης της πρωτεΐνης⁷⁵

Επιπλέον, όσον αφορά την ρύθμιση του ρόλου της CSB από το αμινοτελικό της άκρο, έχει βρεθεί ότι η αφαίρεση των αμινοξέων 245-345 αναιρεί την αλληλεπίδραση της CSB πρωτεΐνης με την NAP1 «μοριακή νταντά». Η αλληλεπίδραση αυτή έχει βρεθεί ότι αυξάνει την λειτουργία αναδόμησης νουκλεοσωμάτων. Είναι ωστόσο κρίσιμο να αναφερθεί ότι το μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος της CSB πρωτεΐνης, παρόλο που δεν είχε δράση τροποποιητή της χρωματίνης, έφερε ακόμα την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με την χρωματίνη και με την ακινητοποιημένη στο σημείο της βλάβης RNAPOLII καθώς και την ικανότητα επιστράτευσης των NER παραγόντων με UV εξαρτώμενο τρόπο⁷⁶.

Σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δομής και τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης παίζουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης αυτής. Συγκεκριμένα, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν την ικανότητα να αλλάζουν την δραστηριότητα ενός ενζύμου, την ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας και της αποικοδόμησης μιας πρωτεΐνης, το

σημείο στο οποίο απαντάται μια πρωτεΐνη, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, την ρύθμιση ποικίλων μονοπατιών σηματοδότησης, την κυτταρική διαίρεση κ.α.⁷⁷ Η κρισιμότητα του ρόλου των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων γίνεται ακόμα πιο εμφανής στην περίπτωση της ρύθμισης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, όταν λόγω των υφιστάμενων αλλοιώσεων του DNA η de novo σύνθεση της πρωτεΐνης δεν αποτελεί καλή εναλλακτική λύση. Έτσι και στην περίπτωση της CSB πρωτεΐνης αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για να μελετηθούν ενδεχόμενες μετά-μεταφραστικές της τροποποιήσεις.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά το ενδεχόμενο φωσφορυλίωσης της CSB πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί μία από τις πιο κοινές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, έχει βρεθεί ότι μετά από έκθεση των κυττάρων σε υπεροξειδίο του υδρογόνου η CSB πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται από την κινάση c-Abl στην θέση 932 (τυροσίνη 932)⁷⁸. Ρόλος της φωσφορυλίωσης αυτής αποτελεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός της CSB στον πυρηνά και στον πυρηνίσκο μετά από έκθεση σε οξειδωτικό στρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση της CSB πρωτεΐνης από την c-Abl παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση οξειδωτικών βλαβών⁷⁸. Επιπροσθέτως, οι Christiansen και συνεργάτες έδειξαν ότι η CSB αποφωσφορυλιώνεται έπειτα από έκθεση σε UV ακτινοβολία, γεγονός που αυξάνει την δραστηριότητα της ως ATPάση⁷⁹. Συμπληρωματικά, μελέτες φασματομετρίας μάζας έχουν αναδείξει αρκετές ακόμα πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης της CSB πρωτεΐνης. Με την βοήθεια του λογισμικού που διατίθεται μέσω του ισότοπου phosphosite plus, προκύπτουν 48 πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης με 1 έως 24 βιβλιογραφικές αναφορές⁸⁰. Κυριότερες εξ αυτών θέσεις -που εμφανίζονται σε πάνω από 20 αναφορές- είναι τα κατάλοιπα σερίνης, τα οποία βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο της CSB πρωτεΐνης στις θέσεις 158, 429, 430, 486 και 489⁸⁰.

Αρκετές συνδέσεις μεταξύ της CSB πρωτεΐνης και της ουβικιτίνης έχουν τεκμηριωθεί. Πρώτον, όπως προαναφέρθηκε, στο καρβοξυτελικό άκρο της CSB έχει εντοπισθεί περιοχή δέσμευσης της ουβικιτίνης (ubiquitin binding domain). Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση του DNA μέσω του μηχανισμού TCR, αφού μετάλλαξη αυτής οδήγησε σε χαμηλότερους ρυθμούς εκτομής και απομάκρυνσης του τμήματος DNA που φέρει την βλάβη⁵⁹. Δεύτερον, οι Groisman και συνεργάτες ταυτοποίησαν την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της CSB μέσω της δράσης της CSA πρωτεΐνης, ενώ οι Wei και συνεργάτες εντόπισαν ένα ανεξάρτητο της CSA πρωτεΐνης μονοπάτι ουβικιτινίωσης της CSB κατά το οποίο η CSB πόλυ-ουβικιτινιώνεται από την πρωτεΐνη BRCA1 σύντομα μετά από την έκθεση σε UV ακτινοβολία, και πριν ακόμα

ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση μέσω TCR^{81,82}. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε μία θέση ουβικιτινώσεως της CSB (στο κατάλυτο λυσίνης 991), η οποία χαρακτηρίστηκε ως απαραίτητη για την γενωμική σταθερότητα και για τον ρόλο που έχει η CSB πρωτεΐνη στην επιδιόρθωση των οξειδωτικών βλαβών μέσω του μηχανισμού BER⁸³. Τέλος, έχει βρεθεί ότι, μετά από έκθεση σε οξειδωτικό στρες, η CSB πρωτεΐνη τροποποιείται μετα-μεταφραστικά μέσω της προσθήκης ADP ριβοζης από το ένζυμο PARP1. Η πολύ-ADP-ριβουσίωση της CSB αναστέλλει την δραστηριότητα της CSB ως DNA εξαρτώμενη ΑΤΡαση⁸⁴.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναλύεται για πρώτη φορά η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της CSB πρωτεΐνης από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη ως απόκριση των κυττάρων στην αναστολή της μεταγραφής.

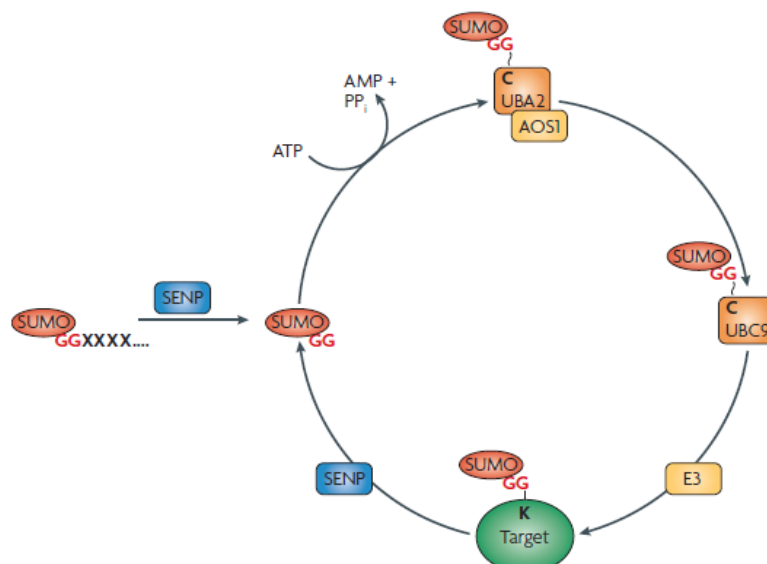
IV) Η SUMO μετά-μεταφραστική τροποποίηση

Η SUMO ή αλλιώς “Small Ubiquitin like MOdifier” είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 10 kDA, της οποίας η τρισδιάστατη δομή μοιάζει πολύ με τη δομή της ουβικιτίνης⁸⁵. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 4 διακριτές SUMO ισομορφές, SUMO 1-4⁸⁶⁻⁸⁹. Οι ισομορφές SUMO 1, 2 και 3 εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, ενώ η SUMO 4 εκφράζεται μόνο στα νεφρά, στην σπλήνα και στους λεμφαδένες^{89,90}. Όλες οι ισομορφές εκφράζονται σε μια πρώιμη αδρανή μορφή και χρειάζονται τη βοήθεια ειδικών SUMO πρωτεασών (SENPs) για να αποκτήσουν ώριμη ενεργή μορφή⁸⁶. Η διαδικασία ωρίμανσης των SUMO πρωτεϊνών, οδηγεί σε έκθεση ενός μοτίβου δι-γλυκίνης στην SUMO πρωτεΐνη⁸⁶. Το μοτίβο αυτό συνδέεται κατά την διαδικασία της SUMOυλίωσης μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου στο αμινοτελικό άκρο της λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου δημιουργώντας έναν ισοπεπτιδικό δεσμό⁸⁶.

Οι ώριμες μορφές των SUMO 2 και SUMO 3 πρωτεϊνών είναι 97% ταυτόσημες, ενώ παρουσιάζουν μόνο 50% ταύτιση με την SUMO 1 ισομορφή⁸⁷. Τα κύτταρα περιέχουν μια δεξαμενή από ελεύθερα μόρια SUMO 2 και 3, ενώ η SUMO 1 εντοπίζεται κυρίως σε δεσμευμένη μορφή σε πρωτεΐνες στόχους⁹¹. Η SUMO-1 φαίνεται να έχει διακριτούς ρόλους σε σχέση με τις SUMO 2 και 3 και μάλιστα, αξίζει να υπογραμμισθεί το γεγονός ότι η σύζευξη των τροποποιητών SUMO 2 και 3 και όχι της SUMO 1, έχει βρεθεί να επάγεται ισχυρά όταν τα κύτταρα υποβληθούν σε στρεσογόνους παράγοντες⁹¹. Η SUMO 2 είναι η μόνη απαραίτητη SUMO πρωτεΐνη καθώς, μόνο τα ποντίκια με έλλειψη της SUMO 2 -και όχι αυτά με έλλειψη της SUMO 1 ή 3- εμφάνισαν σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα που

οδήγησαν σε πρώιμο θάνατο στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης^{92 93 94}.

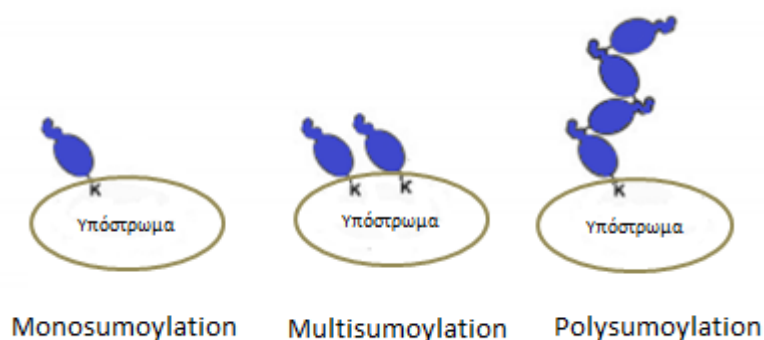
Η διαδικασία της SUMOύλιωσης απαιτεί την λειτουργία μιας κλιμακωτής ενζυματικής αντίδρασης που περιλαμβάνει: ένα E1 ένζυμο ενεργοποίησης (E1 activating enzyme), ένα E2 ένζυμο σύζευξης (E2 conjugating enzyme) και μια E3 λιγάση (Εικόνα 5). Το ένζυμο ενεργοποίησης εκτελεί την ATP-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου της SUMO πρωτεΐνης. Στα θηλαστικά, έχει αναγνωρισθεί ένα ετεροδιμερές ένζυμο ενεργοποίησης, το AOS1 (ή SAE1)/UBA2 (ή SAE2) και ένα ένζυμο σύζευξης, το Ubc9 (Ubiquitin Conjugating Enzyme 9)⁹⁵⁻⁹⁷. Από την άλλη πλευρά, έχουν αναγνωρισθεί αρκετές E3 λιγάσες, συμπεριλαμβανομένων μελών της οικογένειας PIAs, του RANBP2 και του Pc2, οι οποίες δύναται να καθορίζουν την ειδικότητα του στόχου^{98,99}. Η SUMOύλιωση, είναι μία δυναμική διαδικασία, η οποία μπορεί να αντιστραφεί ταχύτατα από την δράση των ίδιων πρωτεασών SENPs που απαιτούνται για την ωρίμανση των πρόδρομων SUMO πρωτεϊνών. Στα θηλαστικά απαντώνται 6 τύποι SENPs (SENP 1-3 και SENP 5-7)¹⁰⁰⁻¹⁰².



Εικόνα 5. Γραφική απεικόνιση του κύκλου της SUMOύλιωσης¹⁰³

Ένα συντηρημένο μοτίβο SUMO δέκτη έχει αναγνωρισθεί και χρησιμοποιείται εύρεως για την αναγνώριση νέων πρωτεϊνών-στόχων της SUMO τροποποίησης¹⁰⁴. Το μοτίβο αυτό αποτελείται από ένα υδροφοβικό αμινοξύ ψ (συνήθως μία ισολευκίνη, λευκίνη ή βαλίνη), την λυσίνη (K) με την οποία συνδέεται η SUMO πρωτεΐνη, ένα ακόμα αμινοξύ χ και ένα γλουταμικό οξύ (E), “ψKχE”. Ωστόσο, πρέπει να σημειώσουμε ότι δεν φέρουν το συγκεκριμένο μοτίβο όλοι οι στόχοι της SUMO τροποποίησης. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες Mdm2, DAxx και CREB παρόλο που έχει βρεθεί ότι SUMOύλιώνονται, καμία από αυτές δεν φέρουν το μοτίβο ψKχE¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Είναι, επίσης, ενδιαφέρον το γεγονός ότι το

συγκεκριμένο μοτίβο δέσμησης υπάρχει και στις ίδιες τις SUMO 2 και 3 πρωτεΐνες, το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι SUMO 2 και 3 πρωτεΐνες, μπορούν όχι μόνο να τροποποιήσουν την πρωτεΐνη στόχο με την πρόσδεση τους σε πολλαπλές λυσίνες (multisumoylation), αλλά και να δημιουργήσουν και πολύ-SUMO αλυσίδα (polysumoylation) (Εικόνα 6)¹⁰⁸.



Εικόνα 6. Διαφορετικοί τύποι SUMO τροποποίησης. Τροποποιημένη από ¹⁰⁹

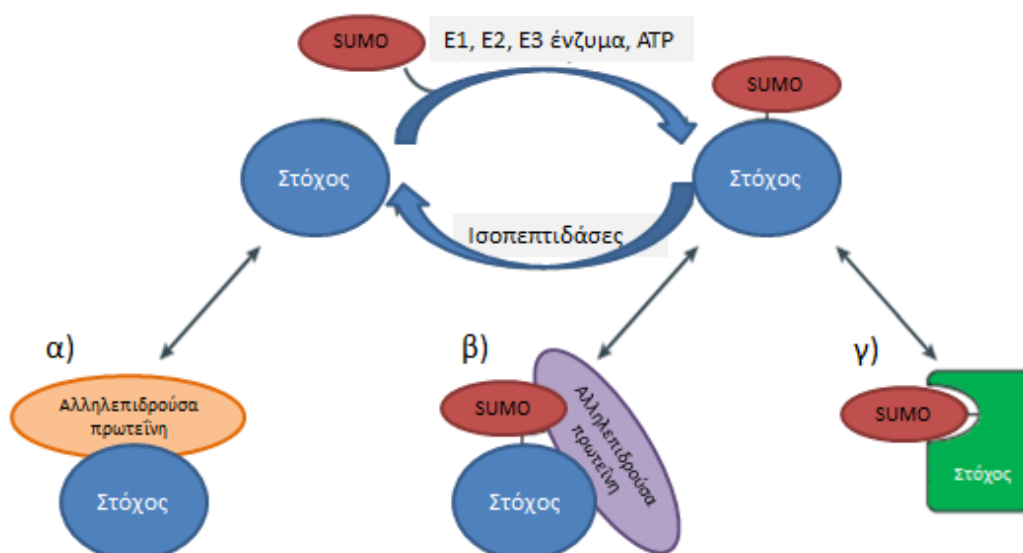
Ενώ το συντηρημένο μοτίβο ψKχE φέρεται να παίζει ρόλο για την ομοιοπολική αλληλεπίδραση του ενζύμου E2 και του υποστρώματος, ένα άλλο μοτίβο το επονομαζόμενο στην διεθνή αλληλογραφία ως “SUMO interacting motif” (SIM), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ή των SUMO πρωτεϊνών και της πρωτεΐνης που φέρει το μοτίβο αυτό. Η ύπαρξη του SIM έχει δειχθεί σε διαφορετικού τύπου πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων που συμμετέχουν στην διαδικασία της SUMOύλιωσης, πρωτεϊνών στόχων της SUMOύλιωσης, πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με SUMOύλιωμένες πρωτεΐνες και στοχευόμενες από SUMO λιγάσες της ουβικιτίνης^{110,111}.

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της SUMO τροποποίησης είναι το επονομαζόμενο “SUMO αίνιγμα”, σύμφωνα με το οποίο μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής δεξαμενής μιας πρωτεΐνης χρειάζεται να SUMOύλιωθεί μια δεδομένη χρονική στιγμή για να επιτευχθεί μέγιστο αποτέλεσμα¹¹². Εξαιρεση του παραπάνω αποτελεί η SUMOύλιωση της RanGAP1, για την οποία απαιτείται η SUMOύλιωση της μισής τουλάχιστον ποσότητας του συνολικού υποστρώματος^{113,114}. Το μοντέλο που έχει προταθεί για να εξηγήσει το SUMO αίνιγμα στηρίζεται στα δύο στάδια της SUMOύλιωσης και της από-SUMOύλιωσης και στο δεδομένο ότι η επίδραση της τροποποίησης διαρκεί και μετά την αφαίρεση της πρωτεΐνης τροποποιητή από την πρωτεΐνη στόχο. Το μοντέλο αυτό βρίσκει ισχύ στο παράδειγμα της SUMOύλιωσης του ενζύμου TDG (Thymine DNA glycosylase)¹¹⁵. Τέλος, εναλλακτική εξήγηση

του SUMO αινίγματος θέλει τη SUMO πρωτεΐνη να επιδρά σε ένα μικρό μέρος της συνολικής πρωτεΐνης στόχου επειδή μόνο αυτό φέρει διαφορετική δομή ή λειτουργία¹⁰³.

V) Ρόλος της SUMOύλιωσης στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

Σε μοριακό επίπεδο, η διαδικασία της SUMOύλιωσης δύναται: α) να μεταβάλλει τις επιφάνειες των πρωτεϊνών-στόχων και ως εκ τούτου να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης-στόχου με άλλα μακρομόρια β) να προσφέρει ένα σημείο δέσμευσης για ένα αλληλοεπιδρών μόριο για παράδειγμα μέσω ενός SIM ή γ) να οδηγήσει σε αλλαγή της στερεοχημικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης-στόχου ¹⁰³ (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Μοριακές συνέπειες της SUMOύλιωσης. Τροποποιημένη από ¹⁰³

Σε κυτταρικό επίπεδο, η SUMOύλιωση διαφορετικών υποστρωμάτων παίζει σημαντικό ρόλο σε σημαντικές διαδικασίες όπως είναι η ενεργοποίηση ή η αναστολή της μεταγραφής, η οργάνωση και η λειτουργία των χρωμοσωμάτων, η διαμόρφωση φυσιολογικών μορφολογικά PML πυρηνικών σωμάτων (PML nuclear bodies) και η στρατολόγηση σε αυτά αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών, η πυρηνική μεταφορά, η επιδιόρθωση του DNA κ.α. ⁹⁹ Όσον αφορά την επιδιόρθωση του DNA, η SUMO τροποποίηση φαίνεται ότι εμπλέκεται σχεδόν σε όλα τα γνωστά μονοπάτια. Μερικά παραδείγματα πρωτεϊνών που λαμβάνουν δράση σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς παρατίθενται στον Πίνακα 3 και τα κυριότερα εξ αυτών αναλύονται παρακάτω.

Μία από τις καλά μελετημένες SUMOυλιωμένες πρωτεΐνες επιδιορθωτικού μηχανισμού είναι η TDG. Η TDG είναι ένα ένζυμο, το οποίο εμπλέκεται στον μηχανισμό BER για την αφαίρεση μίας θυμίνης ή ουρακίλης από τις αταίριαστες σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας βάσεις T-G ή U-G. Η SUMOυλίωση της TDG αποσκοπεί στην καταλυτική ανακύκλωση της πρωτεΐνης που προκαλείται με την αποδέσμευση της TDG από το σημείο της βλάβης και για να επιτευχθεί η αποδέσμευση αυτή απαιτείται αλλαγή στην στερεοχημική διαμόρφωση του ενζύμου^{115 116}. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε από μελέτες της κρυσταλλικής δομής του SUMOυλιωμένου TDG, οι οποίες έδειξαν ότι αυτό είχε ασύμβατη -για δέσμευση του DNA- δομή¹¹⁷.

Δύο ακόμα σημαντικά ένζυμα που μετέχουν σε επιδιορθωτικά μονοπάτια και τα οποία SUMOυλιώνονται, ύστερα από την επίδραση ειδικών αναστολέων, είναι η DNA Τοποϊσομεράση I και II^{118,119}. Έχει βρεθεί ότι η SUMOυλίωση της Τοποϊσομεράσης I, που προκύπτει ύστερα από έκθεση στον αναστολέα καμπτοθεσίνη, επηρεάζει τον εντοπισμό του ενζύμου από τον πυρηνίσκο σε όλον τον πυρήνα¹²⁰. Όσον αφορά δε τον ρόλο της SUMOυλίωσης της Τοποϊσομεράσης II, έχει προταθεί ότι η SUMO τροποποίηση σχετίζεται με την αναστολή της ικανότητας της Τοποϊσομεράσης II να διατηρεί την συνοχή των χρωμοσωμάτων¹²¹.

Η SUMO τροποποίηση παίζει επίσης ρόλο για την επιδιόρθωση του DNA μετά την αντιγραφή. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη PCNA έχει βρεθεί ότι SUMOυλιώνεται κυρίως κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου και ότι η τροποποίηση αυτή δρα ανταγωνιστικά ως προς την ίδια λυσίνη (K164) με την τροποποίηση από την ουβικιτίνη¹²². Αξίζει να σημειωθεί ότι η τροποποίηση από την ουβικιτίνη σε αντίθεση με την SUMOυλίωση λαμβάνει χώρα μόνο μετά από την ύπαρξη βλάβης στο DNA. Η SUMOυλίωση του PCNA στην λυσίνη 164 ελκύει την ελικάση Srs2 για να αποτρέψει τον ανεπιθύμητο ανασυνδυασμό κατά την διάρκεια της σύνθεσης του DNA^{123,124}. Από την άλλη πλευρά, έχει ανακαλυφθεί και δεύτερη θέση τροποποίησης από την SUMO πρωτεΐνη (K127) η οποία δεν αποτελεί στόχο και της ουβικιτίνης. Η SUMOυλίωση του PCNA στην λυσίνη αυτή αναστέλλει την αλληλεπίδραση του PCNA με την Eco1, μια πρωτεΐνη που συμβάλλει στην συνοχή των αδερφών-χρωματίδων κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου¹²⁵.

Τέλος, πρωτεΐνη ενδιαφέροντος για την συγκεκριμένη διατριβή, η οποία SUMOυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις από την SUMO-1 πρωτεΐνη μετά την επίδραση UV ακτινοβολίας και μετέχει στο NER μονοπάτι, είναι η XPC¹²⁶. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η μετάλλαξη των θέσεων τροποποίησης της XPC από την SUMO πρωτεΐνη, παρόλο που δεν επηρεάζει την στρατολόγηση της στο σημείο της βλάβης, οδηγεί σε σταθεροποίηση της

Πίνακας 3. Παραδείγματα πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε επιδιορθωτικά μονοπάτια και τροποποιούνται από την SUMO πρωτεΐνη (επικαιροποιημένος από ¹²⁸)

Πρωτεΐνη	Μονοπάτι που επηρεάζει	Λειτουργία	Οργανισμός	Βιβλιογραφική Αναφορά
XPC	NER	Αναγνώριση της βλάβης μέσω του συμπλέγματος UV-DDB	Θηλαστικά	126,127
TDG	BER	Αποδέσμευση από το αβασικό σημείο βλάβης	Θηλαστικά	115
BRCA1	Ομόλογος ανασυνδυασμός	Αύξηση δραστηριότητας λιγάσης της ουβικιτίνης	In vitro	129
RAD52	Ομόλογος ανασυνδυασμός	Σχηματισμός εξωπυρηνικών σωματιδίων	<i>S. cerevisiae</i> , Θηλαστικά	130,131
XRCC4	Μη ομόλογη ένωση άκρων (NHEJ)	Αλλαγή στην τοποθεσία εντοπισμού	Θηλαστικά	132
Ku70	Μη ομόλογη ένωση άκρων (NHEJ)	Άγνωστη	<i>S. cerevisiae</i>	133
PCNA	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Αναστολή της ανασυνδυασμού, Αναστολή συνοχής λόγω παρεμπόδισης της δέσμευσης του PCNA στο Eco1, στρατολόγηση του Elg1	<i>S. cerevisiae</i> , Πτηνά	122,134-137
RPA	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Διευκόλυνση της στρατολόγησης της RAD51	<i>S. cerevisiae</i> , Θηλαστικά	138,139
BLM	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Αλλαγή στην τοποθεσία εντοπισμού	Θηλαστικά	140
WRN	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Άγνωστη	Θηλαστικά	141
Sgs1	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Άγνωστη	<i>S. cerevisiae</i>	142
TopI	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Αλλαγή στην τοποθεσία εντοπισμού	<i>S. cerevisiae</i>	118,120
TopII	Αντιγραφή, Ανασυνδυασμός, Επιδιόρθωση	Αλλαγή στην συνοχή του κεντρομερούς	<i>S. cerevisiae</i> , Θηλαστικά	118,121

πρωτεΐνης από το σύμπλοκο UV-DDB και σε ελαττωματικό GGR μηχανισμό. Η παραπάνω παρατήρηση, καθώς και το γεγονός ότι απουσία της UV-DDB αποτρέπεται η δράση του μεταλλαγμένου ΧΡC, οδήγησε τους ερευνητές Akita et al να υποστηρίξουν ότι η SUMΟυλίωση του ΧΡC παίζει σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία λειτουργικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ΧΡC και του UV-DDB συμπλόκου, οι οποίες διευκολύνουν την έναρξη της επιδιόρθωσης του DNA¹²⁷.

VI) Ρύθμιση της μεταγραφής

Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι η μεταγραφή από την RNAPOLII είναι μία διαδικασία η οποία ρυθμίζεται πολλαπλώς. Η ρύθμιση της μεταγραφής λαμβάνει χώρα τόσο στα αρχικά στάδια της σύνθεσης του mRNA από τη θέση έναρξης της μεταγραφής, όσο και σε μετέπειτα στάδια, όπου γίνεται παύση της RNAPOLII στο σημείο πλησίον του υποκινητή. Αντιστοίχως ρυθμίζεται και το στάδιο απελευθέρωσης της RNAPOLII και η είσοδος της RNAPOLII στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης καθώς και ο τερματισμός της μεταγραφής.

Πιο αναλυτικά, κατά το πρώτο στάδιο ρύθμισης της μεταγραφής η μετάβαση της RNAPOLII στο κύριο μέρος του γονιδίου εξαρτάται από τον TFIIH και από άλλους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, απαραίτητο βήμα για την έναρξη της μεταγραφής, αποτελεί η φωσφορυλίωση της σερίνης 5, μίας αλληλουχίας επτά πεπτιδίων που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της μεγαλύτερης υπομονάδας της RNAPOLII. Η φωσφορυλίωση αυτή πραγματοποιείται από την κινάση Cdk7, η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου TFIIH.¹⁴³

Επόμενο στάδιο ρύθμισης της μεταγραφής λαμβάνει χώρα, όταν η πολυμεράση φτάσει στα +30 έως στα +50 νουκλεοτίδια από το TSS. Κατά το στάδιο αυτό, η RNAPOLII σταματά σε περιοχές που ονομάζονται θέσεις παύσης της μεταγραφής πλησίον των υποκινητών (Proximal Promoter Pausing Sites, PPP) και κύριοι ρυθμιστές της παύσης αυτής είναι οι παράγοντες DSIF (DRB Sensitivity- Inducing Factor) και NELF (Negative Elongation Factor), οι οποίοι προσδένονται στο νεοσυντιθέμενο μόριο RNA και δεν επιτρέπουν τη περαιτέρω πορεία της πολυμεράσης.¹⁴³

Το επόμενο στάδιο, δηλαδή η φάση επιμήκυνσης της μεταγραφής, ξεκινά από την απελευθέρωση της RNAPOLII από το PPP και ρυθμίζεται από τον παράγοντα P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b). Το σύμπλοκο αυτό επιστρατεύεται στις PPP

περιοχές των γονιδίων και μέσω της κινάσης 9 του συμπλόκου η RNAPOLII φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 2 της αλληλουχίας των επτά πεπτιδίων του καρβοξυτελικού άκρου της μεγαλύτερης υπομονάδας της. Η φωσφορυλιωμένη στη Ser2 RNAPOLII (RNAOLII-Ser2P), αποτελεί την πολυμεράση επιμήκυνσης.¹⁴³

Μεγάλη προσπάθεια έχει γίνει τα τελευταία χρόνια για την κατανόηση των μηχανισμών και της ρύθμισης των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα τόσο σε φυσιολογικές όσο και γενετοξικές συνθήκες. Η χρήση ουσιών, ειδικών αναστολέων παραγόντων της μεταγραφής με ταυτόχρονη χρήση πρωτοκόλλων υψηλής ανάλυσης γονιδιώματος έχει επιτρέψει τον μηχανιστικό έλεγχο και την κατανόηση της δράσης των προαναφερθέντων και άλλων παραγόντων. Ένας τέτοιος αναστολέας, είναι και ο DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole).

Τέτοια ενδιαφέρουσα μελέτη από τον Lavigne et al., ανέδειξε το γεγονός ότι τα ανθρώπινα κύτταρα αποκρινόμενα στο γενετοξικό στρες, μεταπίπτουν σε μία κατάσταση η οποία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «λειτουργία ασφαλείας της μεταγραφής ή safe mode», με αυξημένη απελευθέρωση της RNAPOLII-ser2P στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης.¹⁴⁴ Συγκεκριμένα, έδειξε ότι ο μηχανισμός αυτός άμυνας των κυττάρων προάγει μία καθολική, γρήγορη και συγχρονισμένη εκ νέου απελευθέρωση μορίων RNAPOLII από τις θέσεις παύσης πλησίον των υποκινητών (Proximal Promoter Pausing site- PPP) στο εσωτερικό όλων των ενεργών γονιδίων.¹⁴⁴ Μάλιστα, εξαιρετικό ενδιαφέρον θα έχει και η μελέτη του ίδιου μηχανισμού υπό κατάσταση γενετοξικού στρες.

Σκοπός

Στο κεφάλαιο της Εισαγωγής αναφέρθηκαν οι πολλαπλοί ρόλοι που φέρεται να έχει η πρωτεΐνη CSB τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά κυρίως σε καταστάσεις γενετοξικού στρες. Δεδομένης της μεγάλης ετερογένειας συμπτωμάτων που εμφανίζει το σύνδρομο Cockayne και του γεγονότος ότι η πλειονότητα των ασθενών με CS παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CSB, έχει προταθεί ότι οι πολλαπλοί αυτοί ρόλοι της πρωτεΐνης CSB οφείλονται για την ετερογένεια των συμπτωμάτων καθώς και για την ιστο-ειδικότητα των παθολογικών χαρακτηριστικών που εμφανίζουν ασθενείς με σύνδρομο Cockayne.

Επεκτείνοντας τον συλλογισμό αυτόν, είναι προφανές ότι για να κατανοήσουμε εις βάθος τον ρόλο της CSB πρωτεΐνης στην αιτιολογία της ασθένειας, δεν αρκεί να μελετήσουμε μόνο τη λειτουργία της, αλλά εξίσου σημαντική είναι η μελέτη της ρύθμισης της πρωτεΐνης. Είναι γνωστό ότι, σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δομής και της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης παίζουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης αυτής. Με βάση τα παραπάνω, η διδακτορική αυτή διατριβή έχει ως σκοπό τη μελέτη της **ρύθμισης της CSB πρωτεΐνης μέσω της μετα-μεταφραστικής τροποποίησής της από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη ως απόκριση των κυττάρων σε βλάβες DNA που παρεμποδίζουν την μεταγραφή.**

Δεδομένου του γεγονότος ότι η αδυναμία ανάκαμψης της μεταγραφής και τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης αποτελούν δείκτες ορόσημο των κύτταρων ασθενών με CS ανεξάρτητα από τη συμπτωματολογία τους, η παρούσα διδακτορική έρευνα δεν θα συντελέσει μόνο στην περαιτέρω κατανόηση του ρόλου της CSB πρωτεΐνης στα μονοπάτια αυτά μετά από έκθεση των κυττάρων σε γενετοξικούς παράγοντες, αλλά αναγνωρίζοντας και χαρακτηρίζοντας το μονοπάτι δράσης της SUMOυλιωμένης CSB πρωτεΐνης, η έρευνα αυτή δύναται να αποτελέσει εφελτήριο για την ανακάλυψη μονοπατιών στόχων για την θεραπεία ασθενών με CS.

Υλικά και Μέθοδοι

I) Κυτταρικές αναλύσεις

I1) Κυτταρικές σειρές

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε χρήση της εδραιωμένης, εμπορικά διαθέσιμης κυτταρική σειράς CS1AN, η οποία προέρχεται από ασθενή, τριών ετών θήλυ, με Cockayne Syndrome και είναι αθανατοποιημένη μέσω του ιού SV40 (CS1AN-SV40). Τα κύτταρα αυτά είναι ινοβλάστες του δέρματος που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *ERCC6* (ή *CSB*) που κωδικοποιεί την CSB πρωτεΐνη καταλήγοντας έτσι σε μη λειτουργική πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, τα πρωτογενή κύτταρα CS1AN έφεραν μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου CSB. Το πρώτο αλληλόμορφο έφερε A>T μεταστροφή στο νουκλεοτίδιο 1088 (εξώνιο 5) που οδηγεί σε πρώιμο κωδικόνιο λήξης στο αμινοξύ 337 από τα συνολικά 1493 αμινοξέα, ενώ το δεύτερο αλληλόμορφο έφερε C>T μετάβαση στο νουκλεοτίδιο 2648 (Εξώνιο 15)¹⁴⁵. Μετά την αθανατοποίηση με τον ιό SV40 μόνο το πρώτο αλληλόμορφο διατηρήθηκε στην σειρά CS1AN¹⁴⁵.

Ως φυσιολογικές κυτταρικές σειρές ινοβλαστών δέρματος χρησιμοποιήθηκαν οι εδραιωμένες κυτταρικές σειρές: 1) αγρίου τύπου MRC5 και 2) HA-CSB- CS1AN-SV40 (HA-CSB). Αξίζει να σημειωθεί ότι για τη δημιουργία της κυτταρικής σειράς HA-CSB, έχει προστεθεί σε κύτταρα CS1AN-SV40 με τη βοήθεια πλασμιδίου η λειτουργική πρωτεΐνη CSB, η οποία και έχει σημειωθεί με μια μικρή ακολουθία HA “HA-tagged CSB” (HA-CSB)¹⁴⁶. Τόσο η κυτταρική σειρά MRC5 όσο και η HA-CSB είναι σειρές αθανατοποιημένες μέσω του ιού SV40.

I2) Δημιουργία κυτταρικής σειράς CSB^{ΔSUMO}

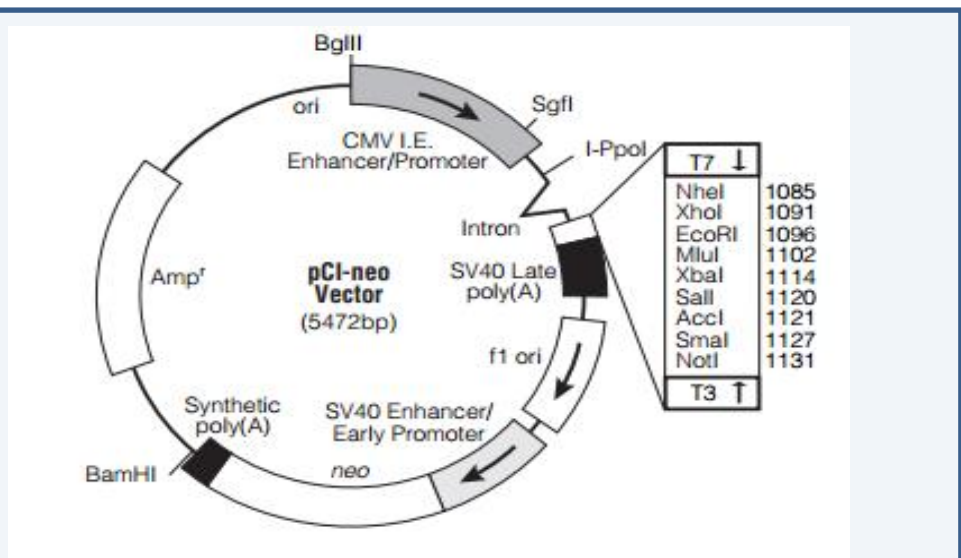
Για την δημιουργία του τριπλού μεταλλάγματος CSB^{ΔSUMO} πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των λυσινών (τριπλετών), της cDNA αλληλουχίας του *CSB* στις θέσεις 32, 205 και 481 σε αλανίνες μέσω της ευρέως διαδεδομένης μεθόδου, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα πρωτόκολλο “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” της εταιρείας Stratagene (200518) χρησιμοποιήθηκε για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 ng/μl (προτεινόμενη ποσότητα: 5-50 ng/μl) και πραγματοποιήθηκαν 18 κύκλοι PCR (προτεινόμενοι κύκλοι: 12-18). Οι αλληλουχίες των ενισχυτών που κατασκευάστηκαν ειδικά για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση παρατιθενται στον Πίνακα 4. Η μεταλλαξιγένεση έγινε διαδοχικά για τις τρεις θέσεις, ώστε το τελικό cDNA που προέκυψε να κωδικοποιεί την τριπλά μεταλλαγμένη

πλέον CSB πρωτεΐνη, CSB^{ΔSUMO}.

Μετά την δημιουργία του τριπλού μεταλλάγματος, το cDNA εισήχθει στον πλασμιδιακό φορέα pCI-neo της εταιρείας Promega (Εικόνα 8). Στη συνέχεια, ακολούθησε η επιλογή των κλώνων που φέρουν το ένθετο cDNA σε θρεπτικό με αμπικιλίνη, και ο έλεγχος του μεταλλάγματος μέσω κοπής με ειδικά για τον πλασμιδιακό φορέα ένζυμα περιορισμού, όπως το BglIII (NEB). Στο σημείο αυτό πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η κυτταρική σειρά ελέχθη και με την διαδικασία της αλληλούχισης.

Πίνακας 4: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του γονιδίου ERCC6

Μεταλλαγή	Θέση αμινοξέος προς μεταλλαγή	Αλληλουχία πριν την μεταλλαγή	Εκκινητής Forward	Εκκινητής Reverse
Μεταλλαγή 1: AAG (Λυσίνη) σε GCG (Αλανίνη)	K32	AAT GAA GAA ATG GCA ATC AAG CAA GAA AGT GGT GGT GAT GG	1F: AAT GAA GAA ATG GCA ATC GCG CAA GAA AGT GGT GGT GAT GG	1R: ATC ACC ACC ACT TTC TTG CGC GAT TGC CAT TTC TTC ATT
Μεταλλαγή 2: AAA (Λυσίνη) σε GCA (Αλανίνη)	K205	ATC CTT GGA GGA GCA GAG GTG AAA ATT GAA CTA GAT CAC GCC	2F: ATC CTT GGA GGA GCA GAG GTG GCA ATT GAA CTA GAT CAC GCC	2R: GGC GTG ATC TAG TTC AAT TGC CAC CTC TGC TCC TCC AAG GAT
Μεταλλαγή 3: AAG (Λυσίνη) σε GCG (Αλανίνη)	K481	GAC AAA GAG AAA CGT CTG AAG CTG GAG GAC GAT TCT GAG	3F: GAC AAA GAG AAA CGT CTG GCG CTG GAG GAC GAT TCT GAG	3R: CTC AGA ATC GTC CTC CAG CGC CAG ACG TTT CTC TTT GTC



Σημεία αναφοράς της pCI-neo αλληλουχίας

Περιοχή άμεσου ενισχυτή/υποκινητή CMV	1-750
Χιμαιρικό ιντρόνιο	890-1022
Περιοχή δέσμησης εκκινητή αλληλουχίας T7/EEV	1053-1074
Υποκινητής της T7 RNA πολυμεράσης (-17 έως+2)	1067-1085
Περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCR)	1085-1135
Υποκινητής της T3 RNA πολυμεράσης (-17 έως+2)	1140-1158
Σήμα καθυστερημένης πολυαδενυλίωσης	1167-1388
Περιοχή f1 φάγου	1483-1938
Εκκινητής και πρῶμος υποκινητής του SV40	2000-2418
Ελάχιστη θέσης έναρξης της αντιγραφής του SV40	2316-2381
Κωδική περιοχή της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης	2463-3257
Συνθετικό σήμα πολυαδενυλίωσης	3321-3369
Κωδική περιοχή της β-λακταμάσης (ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη)	3780-4640

Εικόνα 8. Χάρτης pCI-neo φορέα και σημεία αναφοράς της αλληλουχίας (τροποποιημένη εικόνα από pCI-neo Mammalian Expression Vector technical bulletin)

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η εισαγωγή του πλασμιδίου με μόνιμη διαμόλυνση σε κύτταρα CS1AN-SV, με τη χρήση του πρωτοκόλλου P-PEI. Η βέλτιστη αναλογία μg πλασμιδιακού DNA προς αριθμό κυττάρων (0,5 μg DNA σε 200.000 κύτταρα), ελέγχθη με την χρήση GFP-πλασμιδίου. Κρίνεται σημαντικό να σημειωθεί ότι ο ενισχυτής/υποκινητής

CMV του πλασμιδιακού φορέα έχει ελεγχθεί ως προς την πιθανότητα ενεργοποίησης του μέσω UV ακτινοβολίας και έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζεται κατόπιν εισαγωγής του φορέα σε κύτταρα αθανατοποιημένα μέσω του ιού SV40¹⁴⁷. Για την επιλογή των κλώνων που φέρουν το πλασμίδιο έγινε χρήση του αντιβιοτικού G418 (geneticin, Millipore) σε συγκέντρωση 400 µg/ml.

13) Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές, αρνητικές για μυκόπλασμα (Jena Bioscience), καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Thermo Fisher Scientific) που περιείχε 10% v/v ορό από έμβρυο βοδινού (FBS, Thermo Fisher Scientific) και 1% v/v αντιβιοτικό πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Pen strep, Thermo Fisher Scientific). Το θρεπτικό μέσο των κυτταρικών σειρών HA-CSB και CSB^{ΔSUMO} περιείχε και το αντιβιοτικό G418 (geneticin, Millipore), σε συγκέντρωση 200 µg/ml, για την συνεχή επιλογή των κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο. Η χρήση του αναστολέα της μεταγραφής DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, Calbiochem), έγινε με απευθείας προσθήκη στο θρεπτικό μέσο, την ενδεδειγμένη για την πειραματική διαδικασία ώρα. Τέλος, όλες οι σειρές καλλιεργήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες σε ειδικό θάλαμο επώασης, στον οποίο διατηρήθηκαν τα επίπεδα της θερμοκρασίας (37°C) και του CO₂ (5%) σταθερά.

Η αραίωση (Split) των κυττάρων λάμβανε χώρα 2-3 φορές την εβδομάδα και απαιτούσε σύντομη επώαση των κυττάρων με τρυψίνη (Thermo Fisher Scientific). Η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων γινόταν κατόπιν μέτρησης του συνολικού αριθμού των κυττάρων με τη χρήση του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer.

14) Ακτινοβολήση με UV

Η ακτινοβολήση των κυττάρων με UVC ακτινοβολία πραγματοποιήθηκε με χρήση λάμπας TUV (Philips) σε μήκος κύματος 254 nm. Η ένταση του υπεριώδους φωτός, η οποία υπολογίστηκε στα 0,28 J/sec, ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με τη χρήση του ραδιομέτρου VLX-3W της εταιρείας Vilber. Στα πλαίσια της διατριβής αυτής χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος χαμηλών έως μέτριας έντασης ακτινοβολιών (2,5 J/m² – 20 J/m²) ανάλογα με το επιμέρους πείραμα. Πιο συγκεκριμένα, για τα πειράματα βιωσιμότητας κυττάρων και ικανότητας δημιουργίας αποικιών χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές δόσεις που κυμαίνονταν από 2.5 J/m² έως 7.5 J/m², ενώ για τα πειράματα φασματομετρίας

ροής τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με δόση UV 10 J/m², επαρκή να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου αλλά όχι απόπτωση στα κύτταρα άγριου τύπου. Η ίδια δόση (10 J/m²) χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα κλασματοποίησης κυττάρων. Αντίστοιχα για τα πειράματα επανασύνθεσης RNA, οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 8 και 15 J/m² ώστε να προκληθεί σημαντική μείωση των νεοσυντιθέμενων RNA δύο ώρες μετά το UV και αποκατάσταση τουλάχιστον στο 50% των προ-UV επιπέδων στα κύτταρα άγριου τύπου. Για τα πειράματα ελέγχου γονιδιακής έκφρασης πριν και μετά τη UV ακτινοβολία (RNA-seq) χρησιμοποιήθηκε δόση 8 J/m², για να αποφευχθεί η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού των κυττάρων. Τέλος στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με ή χωρίς διασύνδεση και αλληλούχισης DNA (ChIP-seq), η δόση ήταν 20 J/m² ώστε να επιτευχθεί επαγωγή ικανού αριθμού DNA βλαβών στα ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια για την περαιτέρω ανίχνευση τους και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα εξής στάδια. Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό μέσο των κυττάρων, και γίνει πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε τριβλία petri, ακτινοβολούνται με την ενδεδειγμένη για το πείραμα δόση. Αμέσως μετά την ακτινοβολήση, το θρεπτικό μέσο προστίθεται πίσω στα κύτταρα και τα κύτταρα μεταφέρονται στον ειδικό θάλαμο επώασης.

15) Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων

Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας, 100.000 κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία πετρί (6 well plates) 24 ώρες πριν την ακτινοβολήση. Κατόπιν τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με UV δόση 20 J/m², και φρέσκο θρεπτικό μέσο προστέθηκε σε αυτά. Την επόμενη μέρα (24 ώρες μετά την ακτινοβολήση), υπολογίστηκε ο αριθμός των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων. Ο υπολογισμός των κυττάρων έγινε με την χρήση της χρωστικής Trypan Blue (Sigma-Aldrich) σε αναλογία 1:1. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο συγκεντρώθηκε ώστε να γίνει η μέτρηση των νεκρών κυττάρων, ενώ τα ζωντανά κύτταρα μετρήθηκαν ύστερα από ολιγόλεπτη επώαση σε διάλυμα τρυψίνης.

16) Έλεγχος ικανότητας δημιουργίας αποικιών

Για να ελεγχθεί η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργήσουν αποικίες ("clonogenic survival assay"), 1000 κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία πετρί (p10) και επωάστηκαν για λίγες ώρες στον ειδικό θάλαμο. Έπειτα, τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με

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

17) Κυτταρομετρία ροής

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Πληθυσμός κυττάρων ($5 \cdot 10^6$ κύτταρα) επιστρώθηκε σε τριβλία petri και
- 2) ακτινοβολήθηκε 24 ώρες μετά, με χαμηλή δόση UV 10 J/m², επαρκή να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου αλλά όχι απόπτωση.
- 3) Ύστερα από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα από την ακτινοβολήση (κάθε 2 ώρες) τα κύτταρα επώαστηκαν σε διάλυμα τρυψίνης, συλλέχθηκαν μαζί με το θρεπτικό τους υλικό και μετρήθηκαν.
- 4) Κατόπιν, επιλέχθηκε ένας αριθμός κυττάρων ($1.5 \cdot 10^6$), ο οποίος μονιμοποιήθηκε σε διάλυμα PBS με 0,1% γλυκόζη (D-(+)-Glucose monohydrate_Sigma) και 70% αιθανόλη και επώαστηκε στους -20°C για μία έως επτά ημέρες.
- 5) Επόμενο βήμα αποτέλεσε η έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS η φυγοκέντρωση σε 1200 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία 4°C και η αναδευόμενη επώαση των κυττάρων για 40' σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι με την χρωστική ιωδιούχο προπίδιο (propidium Iodide_Sigma) σε συγκέντρωση 50 µg/ml, παρουσία RNase A (Thermo Fisher Scientific) σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Τα κύτταρα στο στάδιο πριν την επώαση μεταφέρθηκαν σε ειδικά φιαλίδια (FACs tubes) απαραίτητα για την μετέπειτα καταγραφή. Η χρωστική PI, η οποία έχει την ικανότητα δέσμευσης στο DNA, φθορίζει όταν προσδεθεί στο DNA και η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA κάθε κυττάρου. Η ποσότητα του DNA (2N, 4N ή ενδιάμεση) είναι χαρακτηριστική της φάσης του κυτταρικού κύκλου (G1, G2 ή S). Διάλυμα PBS προστέθηκε για να τερματιστεί η αντίδραση.
- 6) Τέλος, τα επίπεδα φθορισμού του εκάστοτε δείγματος κατεγράφησαν με την χρήση

του κυτταρομετρητή ροής FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) του Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλ. Φλέμινγκ», και η επεξεργασία έλαβε χώρα με την χρήση των λογισμικών FACSDiva software (Version 6.0; BD Biosciences) και FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

I 8) Πείραμα ανοσοφθορισμού με χρήση του EU αναλόγου

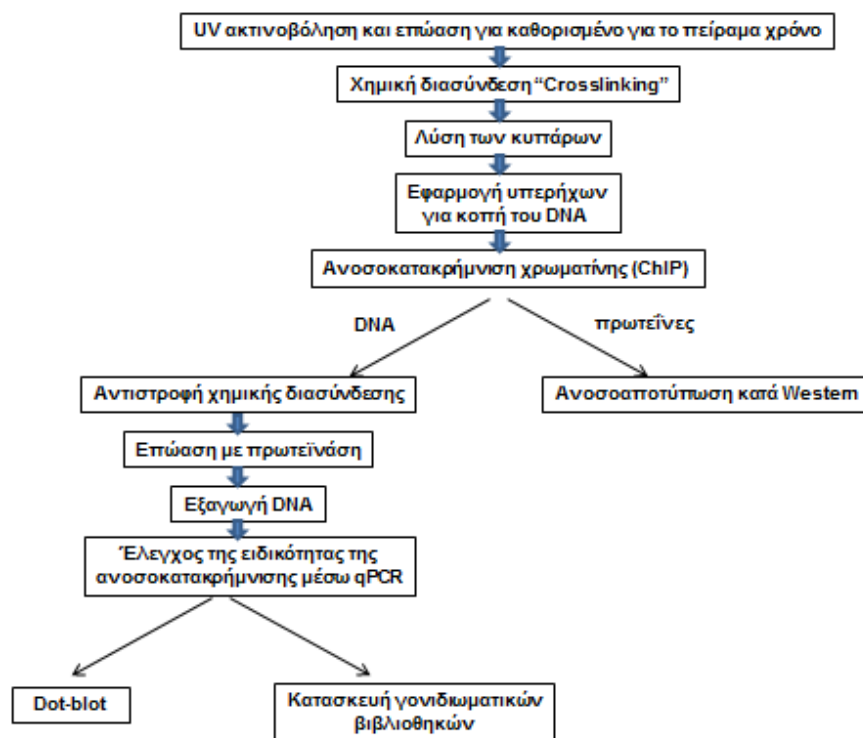
Η πειραματική διαδικασία, η οποία ακολουθήθηκε είναι βασισμένη στο πρωτόκολλο των Nakazawa et al, 2010 και περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια¹⁴⁸.

- 1) Πληθυσμός κυττάρων (100.000 κύτταρα) επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες πάνω σε τριβλία petri και
- 2) ακτινοβολήθηκαν την επόμενη μέρα με διαφορετικές δόσεις (8 J/m² ή 15 J/m²) UV.
- 3) Μετά από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα από την ακτινοβολήση (2 ώρες, όπου αναμένεται η μεγαλύτερη αναστολή σύνθεσης νέων μορίων RNA από την RNAPOLII και 19 ώρες μετά, όπου αναμένεται επανάκαμψη των κυττάρων άγριου τύπου), τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 100 μM 5'ethynyl uridine (EU) (Jena Bioscience), ένα τροποποιημένο ανάλογο της ουριδίνης, το οποίο έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο RNA κατά την διαδικασία σύνθεσης του. Το ανάλογο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την χωρική και χρονική οπτικοποίηση του νεοσυντιθέμενου RNA κατά την μεταγραφή.
- 4) Ακολούθως, μετά από πλύση με PBS, τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά στον πάγο σε διάλυμα PBS το οποίο περιείχε 2% φορμαλδεΐδη, 0,5% Trition X και 300 mM σουκρόζη για την επίτευξη της μονιμοποίησής τους.
- 5) Μετά από μία πλύση με PBS σε θερμοκρασία δωματίου, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα PBS και 0,2% Trition X για αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής τους μεμβράνης.
- 6) Ενώ στην συνέχεια, μετά από τρεις πλύσεις με διάλυμα PBS, έγινε επώαση των κυττάρων για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα που περιείχε 25 μM Alexa Fluor® 594 azide, 10 mM Sodium Ascorbate, 4 mM CuSO₄, 40 u/ml RNase out. Η ισχυρή κλικ-ιτ χημική αντίδραση, που έλαβε χώρα μεταξύ του αλκανίου της τροποποιημένης ουριδίνης και του Alexa αζιδίου του φθορίζοντος ανιχνευτή, επέτρεψε την ανίχνευση του αναλόγου και κατά συνέπεια του νεοσυντιθέμενου μορίου RNA.

7) Ακολούθησαν 3 πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με τη φθορίζουσα χρωστική Dapi, για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και ο εγκιβωτισμός (mounting) των κυττάρων με Mowiol (Sigma). Για την λήψη των εικόνων έγινε χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού Leica με κάμερα Nikon Eclipse. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του ειδικού λογισμικού Image J.

II) Μοριακές αναλύσεις

Για τη μελέτη της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης και των πρωτεϊνών με τις οποίες βρίσκεται σε σύμπλοκο η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος ύστερα από χημική διασύνδεση ακολουθήθηκαν τα στάδια που παρουσιάζονται στην Εικόνα 9. Τα αναφερθέντα στην εικόνα στάδια αναλύονται διεξοδικώς παρακάτω.



Εικόνα 9. Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης και των πρωτεϊνών με τις οποίες βρίσκονται σε σύμπλοκο.

II1) Χημική διασύνδεση (Crosslinking)

Ύστερα από την ακτινοβολία και το πέρας του απαιτούμενου για το πείραμα χρόνου επώασης των κυττάρων, τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από τον θάλαμο επώασης και σε αυτά προστέθηκε διάλυμα φορμαλδεΐδης σε τελική συγκέντρωση 1%. Τα κύτταρα σε αυτό το σημείο επώαστηκαν για 13 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η φορμαλδεΐδη είναι ο χημικός παράγοντας ο οποίος δημιουργεί αναστρέψιμους δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνών-DNA, πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-RNA. Ύστερα από δοκιμές,

βρέθηκε ότι απαιτούνται 13 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή 16 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C για να επιτευχθεί η διασύνδεση των παραπάνω μορίων που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, στις κυτταρικές σειρές ινοβλαστών που χρησιμοποιήσαμε και είναι αθανατοποιημένες από τον ιό SV40.

Για την παύση της περαιτέρω χημικής διασύνδεσης, προστέθηκε γλυκίνη με τελική συγκέντρωση 0,125M. Μετά από πεντάλεπτη επώαση τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τα κύτταρα κατά τη διάρκεια του crosslinking βρίσκονταν ακόμα πάνω στην επιφάνεια του τριβλίου, οπότε και απαιτείται η απόξεση (scraping) των κυττάρων με ειδικό εργαλείο scraper, σε διάλυμα PBS - EDTA (1 mM) – EGTA (0.5 mM) – PMSF (1mM). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα στο σημείο αυτό δύναται να παγωθούν (με στιγμιαίο πάγωμα σε υγρό άζωτο και πάγωμα στους -80°C), ωστόσο για την διεξαγωγή της πλειοψηφίας των πειραμάτων της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, έγινε χρήση κυρίως φρέσκων δειγμάτων.

II 2) Λύση των κυττάρων, απομόνωση πυρηνικού υλικού και κατακερματισμός χρωματίνης (Sonication)

Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε ειδικό διάλυμα λύσης για 10 λεπτά στους 4°C, το οποίο περιείχε 5 mM HEPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, τους ακόλουθους αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422). Η αναλογία διαλύματος-κυττάρων είναι 1.5 ml ανά $2 \cdot 10^7$ κύτταρα.

Στην συνέχεια, οι πυρήνες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 2500 στροφές το λεπτό για 8 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris-Cl pH 8.1, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS, τους προαναφερθέντες αναστολείς πρωτεασών, 1 mM PMSF και 10 mM NaPy. Η αναλογία διαλύματος-κυττάρων είναι 300 μl ανά $2 \cdot 10^7$ κύτταρα.

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια (1.5 ml TPX microtubes) της εταιρείας Diagenode, τα οποία είναι ειδικά για την εφαρμογή των υπερήχων και έγινε χρήση του Bioruptor waterbath sonicator της ίδιας εταιρείας για την επίτευξη της κοπής της χρωματίνης σε τμήματα 100-400 ζευγών βάσεων. Η εφαρμογή των υπερήχων έγινε χρησιμοποιώντας υψηλή ρύθμιση (high) με συχνότητα 30 sec on και 30 sec off, για 30

λεπτά. Το υπερκείμενο, το οποίο συλλέχθηκε ύστερα από φυγοκέντρηση σε 12000 στροφές το λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C, αραιώθηκε τουλάχιστον 5 φορές σε διάλυμα 0.01% SDS, 1.1% Triton X100, 1.2 mM EDTA (pH 8.0), 16.7 mM Tris-Cl, pH 8.1, 167 mM NaCl, τους προαναφερθέντες αναστολείς πρωτεασών, 1 mM PMSF και 10 mM NaPy.

Η χρωματίνη, η οποία σε αυτό το στάδιο μετρήθηκε με την χρήση του ειδικού σπεκτροφωτόμετρου NanoDrop, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Μια μικρή ποσότητα μη ανοσοκατακρημισμένης χρωματίνης του εκάστοτε δείγματος χρησιμοποιήθηκε ως "input".

II 3) Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immuno Precipitation, ChIP)

Η προετοιμασία σφαιριδίων (beads) περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια. Για να αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης προετοιμάστηκαν $(n+1) \times 3 \mu\text{l} \times (\mu\text{g}/\text{αντίδραση})$ από το διάλυμα σφαιριδίων Dynabeads magnetic beads A (10001D) ή G(10003D) της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα που περιέχει τον ανταγωνιστή μη ειδικών θέσεων BSA (Bovine Serum Albumin) σε συγκέντρωση 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.01% SDS, 1.1% Triton X100, 1.2 mM EDTA (pH 8.0), 16.7 mM Tris-Cl, pH 8.1, 167 mM NaCl, προαναφερθέντες αναστολείς πρωτεασών, 1 mM PMSF και 10 mM NaPy. Το διάλυμα των σφαιριδίων αφέθηκε αναδεδυόμενο για ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία 4°C.

Η ποσότητα της χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ήταν 150-200 $\mu\text{g}/\text{ip}$. Για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης, το διάλυμα χρωματίνης όπως προετοιμάστηκε μετά την διαδικασία του sonication, επώαστηκε αναδεδυόμενο ολονύκτια με το αντίσωμα επιλογής σε θερμοκρασία 4°C. Τα αντισώματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρήμνιση ήταν το CSB (goat polyclonal IgG, E18_SC-10459) της εταιρείας Santa Cruz σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{ip}$, το RNAPOLII CTD (rabbit polyclonal, phosphor-S2, ab5095) της εταιρείας Abcam σε συγκέντρωση 3 $\mu\text{g}/\text{ip}$ και τέλος το SUMO (mouse polyclonal, M114-3), δωρεά της εταιρείας MBL International, σε συγκέντρωση 1.5 $\mu\text{g}/\text{ip}$. Την επόμενη ημέρα τα σφαιρίδια διανεμήθηκαν στα δείγματα και το διάλυμα χρωματίνης-αντισώματος και σφαιριδίων επώαστηκε για 3 ακόμα ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C. Μετά την μεταφορά του διαλύματος σε νέα φιαλίδια (για αύξηση του ειδικού σήματος), ακολουθούν πλύσεις με ολιγόλεπτη (7λεπτη) επώαση. Η πρώτη πλύση γίνεται με το διάλυμα πλύσης χαμηλής περιεκτικότητας σε άλας (0.1% SDS, 1% Triton X 100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, προαναφερθέντες

αναστολείς πρωτεασών, 1 mM PMSF και 10 mM NaPy), η δεύτερη με διάλυμα πλύσης υψηλής περιεκτικότητας σε άλας (0.1% SDS, 1% Triton X 100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, προαναφερθέντες αναστολείς πρωτεασών, 1 mM PMSF και 10 mM NaPy), η τρίτη πλύση με διάλυμα πλύσης χλωριούχου λιθίου (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% Sodium Deoxycholate, 1 mM EDTA, προαναφερθέντες αναστολείς πρωτεασών, 1 mM PMSF και 10 mM NaPy) και η τέταρτη με διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

Σε αυτό το σημείο το πρωτόκολλο διαφοροποιείται ανάλογα με το αν μετέπειτα αναλύεται το DNA ή οι πρωτεΐνες που έχουν ανοσοκατακρημνιστεί με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

II 3A) Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για έλεγχο DNA (ChIP PCR, ChIP sequencing, ChIP Dot Blot)

Η ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη εκλύθηκε από τα σφαιρίδια με επώαση των σφαιριδίων σε διάλυμα που περιείχε 1% SDS και 100 mM NaHCO₃, δύο φορές στους 65°C για 15 λεπτά. Επόμενο βήμα αποτέλεσε η λύση της χημικής διασύνδεσης (reverse crosslinking) των δειγμάτων καθώς και των "inputs", η οποία επιτεύχθηκε με ολονύκτια επώασή τους σε διάλυμα που περιέχει 200 mM NaCl σε θερμοκρασία 65°C.

Τόσο τα δείγματα (ChIPs) όσο και τα inputs, υπέστησαν θεραπεία με πρωτεϊνάση K για 1 ώρα στους 55°C, σε διάλυμα TE, 0,5% SDS, και 0.1 ng/ml πρωτεϊνάση K για την επίτευξη πέψης των πρωτεϊνών. Κατακρήμνιση των δειγμάτων για μείωση του όγκου του διαλύματος απαιτήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις. Αυτή επιτεύχθηκε με προσθήκη γλυκογόνου (20 mg/ml), οξικού νατρίου (3 M sodium acetate 1/10 του όγκου του δείγματος), και αιθανόλης (100%, 2,5 φορές ο όγκος του δείγματος) και μεταφορά των δειγμάτων στους -80°C για τουλάχιστον 12-15 ώρες. Ακολούθως έγινε φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για μισή ώρα στους 4°C, δύο πλύσεις με 70% αιθανόλη, 2 δεκαπεντάλεπτες φυγοκεντρήσεις και διάλυση του ιζήματος σε 100 μl 10 mM Tris HCl pH 8.5.

Το DNA των δειγμάτων εξήχθη με την χρήση του Minelute Reaction Cleanup Kit της εταιρείας Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ το DNA των inputs εξήχθη με την χρήση των μαγνητικών σφαιριδίων Ampure XP Beads (Agencourt) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χωρίς επιλογή συγκεκριμένου μεγέθους DNA.

II 3Ai) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης για έλεγχο DNA με qPCR (ChIP PCR)

Το τελικό DNA μετρήθηκε με την χρήση του Qubit 2.0 Fluorometer υψηλής ακρίβειας (dsDNA HS Assay Kit, Thermo Scientific) και η ειδικότητα της ανοσοκατακρήμισης ελέγχθηκε μέσω ποσοτικοποιημένης PCR (quantitative PCR) ανάλυσης και χρήση του μείγματος qPCRBIO SyGreen mix (PCR Biosystems). Παραδείγματα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης με το αντίσωμα της RNAPOLII και του CSB παρατίθενται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Παραδείγματα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης	
Θετικός εκκινητής για έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης από την RNAPOLII	F: GCGGAGTGGAGTAAGTTCGT R: GACCTGAACCTGGGACCTG
Θετικός εκκινητής για έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης από την RNAPOLII	F: GCAAGGAGAGCTCAAGGTCA R: CCTCCTGTTTCTGGGGACTA
Αρνητικός εκκινητής για έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης από την RNAPOLII	F: GGCATCTCTGTCACACTCATTA R: GGAGCCTGTCCCTGTATTTT
Θετικός εκκινητής για έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης από την CSB	F: GGTGAGTAAGGGGTCGGAAC R: ACCCCTTCTCCTTTCTAAATCC
Αρνητικός εκκινητής για έλεγχο της ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης από την CSB	F: ATGGACACACACAACCAAGG R: CAAGTTATTGGTTTGTTCAGGTTTT

II 3Aii) Κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και αλληλούχιση του DNA (ChIP sequencing)

Η κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών έγινε σύμφωνα με τυποποιημένα πρωτόκολλα της Illumina με ελάχιστες τροποποιήσεις. Τα ένζυμα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των βιβλιοθηκών ήταν της εταιρείας NEB, και η

χρήση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, για την κατασκευή βιβλιοθηκών των δειγμάτων που προέκυψαν από την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης αρχικής συγκέντρωσης (5-10 ng), δημιουργήθηκαν σε αυτά τυφλά άκρα, προστέθηκε ουρά αδενίνης και στη συνέχεια επικολλήθηκαν τα ειδικά Illumina μόρια (NEBNext adapters) που περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες (indexes). Το DNA των βιβλιοθηκών πολλαπλασιάστηκε με την αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR). Για να αποφευχθεί υπέρ-πολλαπλασιασμός των δειγμάτων, τα δείγματα υφίστατο δοκιμαστικό πολλαπλασιασμό με qPCR για εύρεση των απαραίτητων κύκλων πολλαπλασιασμού και εκ νέου πολλαπλασιασμό με συμβατική PCR. Το μέγεθος των βιβλιοθηκών, το οποίο προέκυψε ύστερα από καθαρισμό και επιλογή συγκεκριμένου μεγέθους βιβλιοθηκών (200-500 ζεύγη βάσεων) με τα ειδικά μαγνητικά σφαιρίδια (Agencourt Ampure XP beads, Beckman) καθώς και η ποιότητα των βιβλιοθηκών ελέγχθηκε με τη βοήθεια του Bioanalyzer (High Sensitivity DNA kit, Agilent). Στη συνέχεια οι βιβλιοθήκες απεστάλησαν για αλληλούχιση στην Genecore-EMBL, όπου και έγινε χρήση του Illumina HiSeq 2000.

II 3Aiii) Ανοσοαποτύπωση κουκκίδας (Dot Blot)

Μετά τη μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων (“ChIPs” και “Inputs”) και την δημιουργία αραιώσεων συγκεκριμένης συγκέντρωσης τελικού όγκου 70 μl (σε διάλυμα TE), τα δείγματα υπέστησαν 10λεπτο βρασμό και γρήγορη μεταφορά στον πάγο. Ακολούθησε γρήγορη φυγοκέντρηση (quick spin), προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού SSC (30%) στα δείγματα και μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (LI-COR Odyssey Nitrocellulose membrane, LI-COR Biosciences). Η μεταφορά αυτή πραγματοποιήθηκε με χρήση του MINIFOLD I dot-blot system, και μάλιστα έπειτα από διπλή πλύση των πηγαδιών με TE. Στην συνέχεια, έγινε τριπλή πλύση των πηγαδιών με ρυθμιστικό διάλυμα (70% TE-30% SSC).

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η επώαση της μεμβράνης στους 80°C για 2 ώρες και ο κορεσμός των μη ειδικών θέσεων προσδέσεως των αντισωμάτων (blocking) με ολονύκτια επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα PBS:LI-COR (αναλογία 1:1) (LICOR Blocking Buffer_LICOR Biosciences) σε θερμοκρασία 4°C υπό ανάδευση. Ακολούθως η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο ανιχνεύει τις βλάβες από CPDs (CosmoBio USA, CAC-NM-DND-001) κατάλληλης συγκέντρωσης (1:1000), σε διάλυμα PBS:LI-COR, 0,1%Tween, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από πλύση της μεμβράνης με διάλυμα PBS-Tween 0,1% (4 φορές επί 5 λεπτά υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου), η μεμβράνη επώαστηκε με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (α-mouse 800), συμβατό με

το σύστημα “Odyssey CLx Infrared Imaging System” (LICOR Biosciences), για 1 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Η επιλογή του δευτερογενούς αντισώματος έγινε ανάλογα με τον οργανισμό στον οποίο είχε παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1/10000 σε διάλυμα PBS:LI-COR, 0,1%Tween. Τέλος, η μεμβράνη πλύθηκε με διάλυμα PBS-Tween 0,1% (4 φορές επί 5 λεπτά, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου) και μία φορά με διάλυμα PBS.

Για την ανίχνευση των βλαβών CPD στο DNA των δειγμάτων η μεμβράνη σαρώνεται από το ειδικό σύστημα Odyssey.

II 3B) Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immuno Precipitation_CHIP) και έλεγχος πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western)

Για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν οι προκατασκευασμένες γέλες (precast gel) πολυακρυλαμιδίου με διαβαθμισμένη συγκέντρωση 4-15% (Mini Protean TGX gel) της εταιρείας Biorad και 4-12% (NuPAGE Bis Tris Mini Gel) της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Ανάλογα με την επιλογή του πηκτώματος, έγινε και η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση, σύμφωνα τις οδηγίες της εταιρείας παραγωγής της γέλης.

Τα προς ανάλυση πρωτεϊνικά δείγματα ανοσοκατακρημνισμένα και συνδεδεμένα σε μαγνητικά σφαιρίδια όπως αναλύεται παραπάνω, αναμίχθηκαν σε αναλογία 3:1 με 4x ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli, υπέστησαν βρασμό στους 95°C για 45 λεπτά, ώστε να αναστρεφούν πλήρως οι χημικές διασυνδέσεις των μακρομορίων των δειγμάτων, φυγοκεντρήθηκαν και εισήχθησαν στο πήκτωμα. Στο πήκτωμα επίσης προστέθηκε πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (Precision Plus Protein WesternC Standards, Biorad). Τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 110 -130 V.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πάνω μέρος του πηκτώματος (που φέρει τις πρωτεΐνες άνω των 100 kDA) μεταφέρθηκε σε μεμβράνη polyvinylidene fluoride (PVDF Immobilon-FL), η οποία είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί με επώαση σε μεθανόλη, και τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) που περιέχει 1% SDS. Το κάτω μέρος του πηκτώματος (που φέρει τις πρωτεΐνες κάτω των 100 kDA) τοποθετήθηκε σε μεμβράνη νιτροσελουλόζης (LI-COR Odyssey Nitrocellulose membrane, LI-COR Biosciences) σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) που περιέχει 20% μεθανόλη. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται με την χρήση ειδικών συσκευών μεταφοράς ακολουθώντας τυποποιημένα πρωτόκολλα. Η συσκευή ηλεκτροδοτείται με τάση 28 V για

ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία 4°C.

Οι μεμβράνες οι οποίες πλέον έφεραν τις αναλυμένες πρωτεΐνες επώαστηκαν για 1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, σε διάλυμα PBS:LI-COR (αναλογία 1:1) (LICOR Blocking Buffer_LICOR Biosciences) για να επιτευχθεί κορεσμός των μη ειδικών θέσεων προσδέσεως των αντισωμάτων (blocking).

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα κατάλληλης συγκέντρωσης, σε διάλυμα PBS:LI-COR, 0,1%Tween, σε θερμοκρασία 4°C. Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και αναφέρονται στην διατριβή είναι: το RNAPOLII CTD (rabbit polyclonal, phosphor-S2, ab5095, Abcam), σε συγκέντρωση 1/1500, το CSB E-18 (goat polyclonal IgG, sc-10459, Santa Cruz), σε συγκέντρωση 1/250, SUMO 2/3 (rabbit polyclonal, 07-2167, Millipore) σε συγκέντρωση 1/500, αντισώματα μέρους του Cell Cycle/Checkpoint Antibody Sampler Kit #9917 της εταιρείας Cell signaling, σε συγκεντρώσεις 1/1000.

Στην συνέχεια, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα και στην παράγραφο “dot blot”, η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα PBS-Tween 0,1%, επώαστηκε με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα σε συγκέντρωση 1/10000, εκπλύθηκε ξανά με διάλυμα PBS-Tween 0,1% και μία φορά με διάλυμα PBS. Για την απεικόνιση των προκυπτουσών πρωτεϊνικών ζωνών, έγινε σάρωση της μεμβράνης από το ειδικό σύστημα Odyssey. Το σύστημα αυτό προσφέρει την δυνατότητα της ταυτόχρονης απεικόνισης και ποσοτικής μέτρησης δύο διαφορετικών πρωτεϊνών-στόχων, για τις οποίες όμως τα πρωτογενή αντισώματα έχουν αναπτυχθεί σε διαφορετικό οργανισμό. Το παραπάνω επιτυγχάνεται λόγω σύνδεσης του δευτερογενούς αντισώματος με φασματικά διακριτές φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες ανιχνεύονται σε ανεξάρτητα κανάλια φθορισμού (IRDye 680 και IRDye800).

II4) Κλασματοποίηση των κυττάρων (Cell fractionation)

II4α) Κλασματοποίηση των κυττάρων (Cell fractionation) μέσω ομογενοποιητή Dounce και χρήση μικροκοκκικής νουκλεάσης

Για τη μελέτη των πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες στην χρωματίνη ύστερα από κλασματοποίηση των κυττάρων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

- Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με τρυψίνη και ο αριθμός τους μετρήθηκε.
- Ακολούθησε διπλή πλύση των κυττάρων με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

- Στην συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C σε υποτονικό διάλυμα το οποίο περιείχε 25 mM HEPES pH 8.0, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% NP-40, 1 mM DTT και τους ακόλουθους αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422). Η αναλογία διαλύματος-κυττάρων είναι 3,1 ml ανά $1 \cdot 10^8$ κύτταρα.
- Τα κύτταρα λύθηκαν με την χρήση του ομογενοποιητή Dounce (x 14 φορές). Η επιτυχία της λύσης ελέγχθηκε με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου και της χρωστικής trypan blue.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων (1800 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C). Το υπερκείμενο των δειγμάτων, τα οποία αποτέλεσαν τις κυτταροπλασματικές διαλυτές πρωτεΐνες (cytoplasmic soluble) συλλέχθηκαν στο σημείο αυτό.
- Έπειτα, οι πυρήνες των κυττάρων επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C σε διάλυμα εκχύλισης, το οποίο περιείχε 20 mM Tris HCl pH 6.8, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 1 mM DTT και τους ακόλουθους αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422). Η αναλογία διαλύματος-κυττάρων είναι 1,1 ml ανά $1 \cdot 10^8$ κύτταρα.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων (2400 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C). Το υπερκείμενο των δειγμάτων αυτών αποτέλεσαν τις πυρηνικές διαλυτές πρωτεΐνες (nuclear soluble) και συλλέχθηκαν στο σημείο αυτό.
- Το ίζημα των δειγμάτων (η χρωματίνη) ξεπλένεται σε διάλυμα 20 mM Tris HCl pH 6.8, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 300 mM Sucrose, 0.1% Triton X-100, και τους ακόλουθους αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422). Η αναλογία διαλύματος-αρχικός αριθμός κυττάρων είναι 1,1 ml ανά $1 \cdot 10^8$ κύτταρα. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται (2400

στροφές ανά λεπτό για 7 λεπτά στους 4°C).

- Το υπερκείμενο των δειγμάτων (διαλυτή χρωματίνη) επωάζεται για 20 λεπτά στους 37°C σε διάλυμα μικροκοκκικής νουκλεάσης (μνάσης), το οποίο περιελάμβανε 2U Microcal Nuclease (NEB) και 20 mM Tris HCl pH 6.8, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 300 mM Sucrose, 0.1% Triton X-100, και τους ακόλουθους αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422). Η αναλογία διαλύματος-κυττάρων είναι 1,1 ml ανά $1 \cdot 10^8$ κύτταρα.
- Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 5 mM EDTA και 5 mM EGTA.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε 2400 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο περιείχε τις πρωτεΐνες που ήταν δεσμευμένες στην χρωματίνη και απελευθερώθηκαν ύστερα από επώαση με μνάση (συνδεδεμένο στην χρωματίνη κλάσμα μετά από μνάση).
- Στο ίζημα, το οποίο προέκυψε από την φυγοκέντρηση προστέθηκε διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (25 mM HEPES pH 8.0, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, τους αναστολείς πρωτεασών της εταιρείας Sigma-Aldrich (E-64 (E3132), Bestatin (10874515001), Aprotinin (10981532001), Trypsin-Chymotrypsin (T9777), Leupeptin (11034626001), Pepstatin (11359053001) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 1 mM PMSF και 10 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (NaPy S6422). Η αναλογία διαλύματος-κυττάρων είναι 0.86 ml ανά $1 \cdot 10^8$ κύτταρα. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια (1.5ml TPX microtubes) της εταιρείας Diagenode, τα οποία είναι ειδικά για την εφαρμογή των υπερήχων και έγινε χρήση του Bioruptor waterbath sonicator της ίδιας εταιρείας για την επίτευξη της κοπής του DNA σε τμήματα 100-400 ζευγών βάσεων. Η εφαρμογή των υπερήχων έγινε χρησιμοποιώντας την υψηλή ρύθμιση (high) με συχνότητα 30 sec on και 30 sec off, για 7,5 λεπτά. Το υπερκείμενο, το οποίο συλλέχθηκε ύστερα από φυγοκέντρηση σε 10000 στροφές το λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C αποτέλεσε τις πρωτεΐνες δεσμευμένες στην χρωματίνη ύστερα από εφαρμογή υπερήχων (συνδεδεμένο στην χρωματίνη κλάσμα μετά από χρήση υπερήχων).
- Το ίζημα, το οποίο προέκυψε αποτέλεσε και το εναπομένον ίζημα (pellet)

II 4β) Κλασματοποίηση κυττάρων μέσω ψύξης-απόψυξης

Ένας αριθμός κυττάρων επιστρώθηκαν σε τριβλία petri 24 ώρες πριν την ακτινοβολήση. Μετά την ακτινοβολήση με UVC δόση (10 J/M^2), τα κύτταρα επώαστηκαν για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και 1 εκατομμύριο εξ αυτών συλλέχθηκε. Η κυτταρική πελλέτα εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και έπειτα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα ίσο με 2 φορές τον όγκο της πελλέτας (25 mM Hepes-KOH pH 7.6, 0.45 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 12 mM NaF, 25% Glycerol, 0.5 mM 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ αναστολείς πρωτεασών (Sigma: E64, Bestatin, Aprotinin, Trypsin-Chymotrypsin, Leupeptin and Pepstatin) και 10 mM Sodium Pyrophosphate tetrabasic decahydrate. Το PMSF, οι αναστολείς πρωτεασών και το NaPy προστίθενται φρέσκα στο διάλυμα. Έπειτα, λαμβάνει χώρα η κλασματοποίηση κυττάρων μέσω 3 κύκλων ψύξεως-απόψυξεως, όπου τα κύτταρα εμβαπτίζονται σε υγρό άζωτο (snapfrozen) για 3 λεπτά και σε υδατόλουτρο 30°C για 2 λεπτά. Στο τελευταίο βήμα απόψυξης τα κύτταρα επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρώνονται στις 13000 στροφές ανά λεπτό για να ιζηματοποιηθούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ίσες ποσότητες πρωτεϊνών, οι οποίες ταυτοποιούνται με χρήση της τυποποιημένης διαδικασίας μέτρησης πρωτεϊνών με την χρωστική Bradford (Bradford protein Assay Dye Reagent Concentrate, Biorad) αναμειγνύονται με το διάλυμα 2x Laemmli SDS sample buffer και επωάζονται για 15 λεπτά στους 95°C . Έπειτα, λαμβάνει χώρα η ανοσοαποτύπωση ζωνών, όπως αναλύεται και παραπάνω. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μέρος ενός kit της εταιρείας Cell Signaling (the Cell Cycle/Checkpoint Antibody Sampler Kit (9917), το οποίο περιελάμβανε τα: Phospho-cdc2 (Tyr15) (10A11) Rabbit mAb 4539, Phospho-Chk1 (Ser345) (133D3) Rabbit mAb 2348, Phospho-Chk2 (Thr68) (C13C1) Rabbit mAb 2197, Phospho-Rb (Ser807/811) (D20B12) XP[®] Rabbit mAb 8516 and Phospho-Rb (Ser795) Antibody 9301).

II 5) Συλλογή, επεξεργασία και αλληλούχιση ώριμων PolyA μεταγράφων mRNA (RNA sequencing)

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Το συνολικό RNA των τριών κυτταρικών σειρών συλλέχθηκε σε διάλυμα τριζόλης

(Life Technologies), σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 6 ώρες, 19 ώρες και 48 ώρες) μετά από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, και απομονώθηκε βάση του τυποποιημένου πρωτοκόλλου εξαγωγής RNA με τριζόλη-χλωροφόρμιο. Το γενωμικό DNA αφαιρέθηκε με επώαση των δειγμάτων με την TURBO DNάση (Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η δόση UV που χρησιμοποιήθηκε ήταν 8 J/m^2 για να αποφευχθεί η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού των κυττάρων.

- 2) Στην συνέχεια το ώριμο mRNA (που φέρει πολύ-A ουρά) απομονώθηκε από το συνολικό RNA με την χρήση του NEBNext Oligo d(T)25 mRNA kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- 3) Μέρος του mRNA που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την κατασκευή cDNA μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής για την πραγματοποίηση ελέγχου της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των κυτταρικών σειρών μέσω qPCR. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) και ο ενισχυτής oligo d(T) (Thermo Fisher Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- 4) Έχοντας επιβεβαιώσει την ποιότητα του υλικού, προχωρήσαμε στην δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών. Για την επίτευξη του παραπάνω ήταν καταρχάς απαραίτητη η θερμική τμηματοποίηση (fragmentation) του mRNA με επώαση στους 94°C για 4 λεπτά, σε ειδικό διάλυμα First strand synthesis buffer (Thermo Science Scientific) μέρος του SuperScript II kit (Life Technologies) και 10mM DTT. Στα RNA, αμέσως μετά την τμηματοποίηση, προστέθηκαν 0.6 μg από τον εκκινητή τυχαίας ακολουθίας 6 βάσεων random hexamer (Thermo Science Scientific) παρουσία RNase out (Thermo Science Scientific), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την υβριδοποίηση σε τυχαία συμπληρωματικά τμήματα και ακολουθήθηκε μονόλεπτη επώαση στους 50°C . Ακολούθως, προστέθηκε διάλυμα, το οποίο περιείχε 100U του ενζύμου SuperScript II, 0.5mM dNTPs και 4mM DTT, οπότε και τα RNAs επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 25°C , για 50 λεπτά στους 42°C και τέλος για 15 λεπτά στους 70°C . Η δημιουργία δίκλωνου τμήματος DNA επετεύχθει με επώαση 2 ωρών στους 16°C σε διάλυμα, το οποίο περιελάμβανε 24 U DNA polII, 20 U RNase H και 0,33 mM dNTPs (Life Technologies) σε 1 x Second Strand Synthesis Buffer (NEBNext). Το δίκλωνο cDNA συγκεκριμένου μεγέθους καθαρίστηκε και επιλέχθηκε με την χρήση των ειδικών σφαιριδίων (Agencourt Ampure XP beads, Beckman).
- 5) 5-10 ng δίκλωνου cDNA χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν, να ελεγχθούν,

και να αποσταλθούν για αλληλούχιση cDNA βιβλιοθήκες βάση του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στην υποπαράγραφο II, 3Aii) Κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και αλληλούχιση του DNA (ChIP sequencing)

II 6) Συλλογή, επεξεργασία και αλληλούχιση νεοσυντιθέμενων μεταγράφων RNA παρουσία ή απουσία του αναστολέα της επιμήκυνσης της μεταγραφής DRB (preDRB-nascent RNA sequencing)

Το χρονοδιάγραμμα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 10.

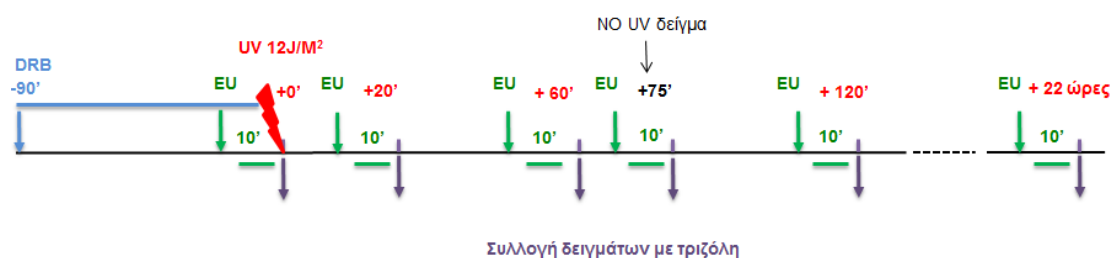
Για τη μελέτη του νεοσυντιθέμενου RNA τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα της μεταγραφής DRB (100 μ M) για 90 λεπτά με σκοπό όλες οι πολυμεράσες που είχαν ξεκινήσει επιμήκυνση ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων πριν την προσθήκη του αναστολέα να έχουν ολοκληρώσει τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών. Ο χρόνος αυτός βρέθηκε, μετά από έλεγχο με qPCR γονιδίων >100kb, ότι είναι αρκετός για να ολοκληρωθεί η μεταγραφή των ήδη δεσμευμένων σε γονίδια RNA πολυμερασών. Έτσι, θεωρείται στιγμή μηδέν (t=0), ο χρόνος 90 λεπτά μετά από επώαση με DRB, κατά τον οποίο ο αριθμός των RNA πολυμερασών επιμήκυνσης της μεταγραφής είναι πλέον μηδενικός. Κατά την στιγμή αυτή το θρεπτικό μέσο με DRB αφαιρείται, τα κύτταρα ακτινοβολούνται με την ενδεδειγμένη για το πείραμα δόση (12 J/m²) χωρίς να γίνει πρώτα πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, και φρέσκο θρεπτικό μέσο προστίθεται στα κύτταρα. Στο σημείο αυτό αναμένεται η επανεκκίνηση της μεταγραφής λόγω «απελευθέρωσης» των πολυμερασών που βρίσκονται εγκλωβισμένες στην περιοχή παύσης της επιμήκυνσης πλησίον των υποκινητών των γονιδίων «Promoter-proximal Pausing Site (PPP)» και νέα σύνθεση RNA μορίων.

Για την σήμανση των νεοσυντιθέμενων μορίων RNA, πριν την συλλογή με τριζόλη, απαραίτητη είναι η δεκάλεπτη επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 100 μ M EU, το τροποποιημένο ανάλογο της ουριδίνης το οποίο όπως προαναφέρθηκε ενσωματώνεται στο RNA κατά την σύνθεση του.

Η συλλογή του συνολικού RNA έλαβε χώρα ύστερα από επώαση με φρέσκο θρεπτικό μέσο, απουσία DRB, για 0, 20, 60 λεπτά, 2 και 22 ώρες μετά από την επίδραση

υπεριώδους ακτινοβολίας. Δείγμα ελέγχου της διαδικασίας, το οποίο δεν είχε ακτινοβοληθεί, συλλέχθηκε 75 λεπτά μετά την αφαίρεση του DRB.

Το συνολικό RNA απομονώθηκε βάση του τυποποιημένου πρωτοκόλλου εξαγωγής RNA με τριζόλη-διάλυμα χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης, το οποίο περιελάμβανε και την αφαίρεση του γενωμικού DNA με επώαση των δειγμάτων με την TURBO DNάση, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 10. Χρονοδιάγραμμα πειράματος μελέτης νεοσυντιθέμενου RNA μετά την προσθήκη του αναστολέα DRB.

Η απομόνωση του νεοσυντιθέμενου RNA από το συνολικό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ειδικού πρωτοκόλλου Click-iT Nascent RNA Capture Kit (Life Technologies), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η Click-iT χημική αντίδραση, που έλαβε χώρα μεταξύ του αλκανίου του EU και του αζιδίου βιοτίνης (0.5 mM biotin azide) και η μετέπειτα πρόσδεση του συμπλέγματος σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads Myone Streptavidin) επέτρεψε την απομόνωση του ανάλογου και κατά συνέπεια του νεοσυντιθέμενου μορίου RNA.

Τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA, τα οποία ήταν δεσμευμένα στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, υπέστησαν τα στάδια θερμικής τμηματοποίησης, δημιουργίας μονόκλωνου και μετέπειτα δίκλωνου cDNA (First and Second strand synthesis), όπως αυτά περιγράφονται στην παράγραφο «Συλλογή και επεξεργασία mRNA (mRNA sequencing), υποπαράγραφο II 5)». Σημαντική διαφορά αποτέλεσε το γεγονός ότι τα φιαλίδια (pcr tubes), τα οποία περιείχαν τα RNAs δεσμευμένα στα σφαιρίδια έπρεπε να ανακινούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα και μετά το πέρας της δημιουργίας δίκλωνου cDNA. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε μαγνήτη και το υπερκείμενο που περιείχε τα cDNA μόρια συλλέχθηκε και καθαρίστηκε με τα μαγνητικά σφαιρίδια (Agencourt Ampure XP beads).

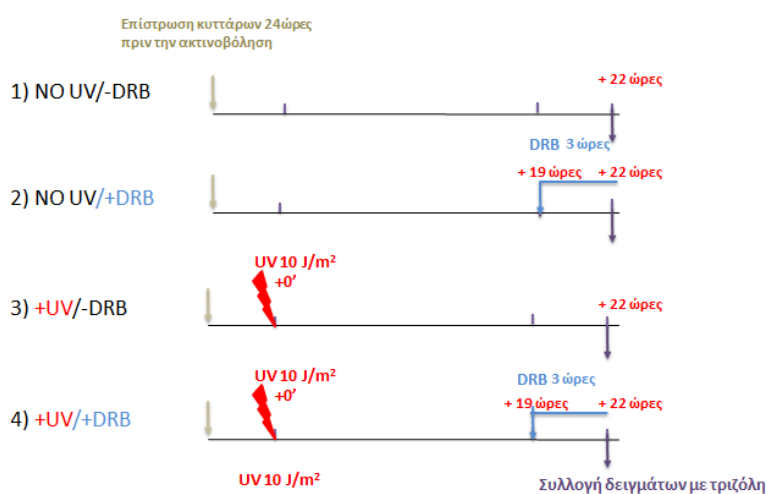
Τέλος, τα cDNA μόρια που παρήχθησαν, τα οποία αντικατοπτρίζουν τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA, χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν, να ελεγχθούν, και να αποσταθούν

για αλληλούχιση cDNA βιβλιοθήκης βάση του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στην υποπαράγραφο II 3Aii) Κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και αλληλούχιση του DNA (ChIP sequencing)

II 7) Έλεγχος παραμονής του πρόδρομου RNA, παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής DRB, 22 ώρες μετά από UV ακτινοβολία.

Περιγραφή του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 11.

Για τη μελέτη του πρόδρομου RNA (RNA το οποίο δεν έχει υποστεί ωρίμανση), επιστρώθηκαν κύτταρα των τριών κυτταρικών σειρών HA-CSB, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO}. Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν ή όχι 24 ώρες μετά με την ενδεδειγμένη για το πείραμα δόση (10 J/m²) και 22 ώρες μετά συλλέχθηκαν παρουσία ή απουσία DRB. Ο αναστολέας DRB προστέθηκε 3 ώρες πριν την συλλογή των κυττάρων και στόχος ήταν να μηδενισθεί ο αριθμός των νεοσυντιθέμενων μορίων RNA, που θα μπορούσαν να προκύψουν μέσα στις 3 αυτές τελευταίες ώρες λόγω νέας εκκίνησης της μεταγραφής.



Εικόνα 11. Πειραματικός σχεδιασμός των δειγμάτων και των απαραίτητων δειγμάτων ελέγχου για τη μελέτη εμπλουτισμού του νεοσυντιθέμενου RNA στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων

Το συνολικό RNA των δειγμάτων συλλέχθηκε με τριζόλη και η εξαγωγή και ο καθαρισμός του από το γενωμικό DNA πραγματοποιήθηκε, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Στην συνέχεια το συνολικό RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την δημιουργία cDNA που

θα αντικατοπτρίζει τόσο τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA όσο το ώριμο mRNA. Για να επιτευχθεί το παραπάνω γίνεται χρήση του εκκινητή τυχαίας ακολουθίας 6 βάσεων random hexamer (Thermo Science Scientific) για δημιουργία μονόκλωνου cDNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το cDNA, το οποίο παρήχθει, ελέγχεται με qPCR και συγκεκριμένα συγκρίνεται ο εμπλουτισμός (enrichment) των εκκινητών που βρίσκεται στο 5' και 3' του γονιδίου. Οι εκκινητές, οι οποίοι σχεδιάστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη και παρατίθενται στον Πίνακα 6, βρίσκονται σε ιντρόνια οπότε και επιτρέπουν την μελέτη μόνο του πρόδρομου RNA και όχι του ώριμου mRNA που δεν περιέχει ιντρόνια.

Πίνακας 6. Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη εμπλουτισμού του νεοσυντιθέμενου RNA στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων			
Όνομα γονιδίου	Μέγεθος γονιδίου (kb)	Θέση του ενισχυτή στο γονίδιο σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS)	Ακολουθία ενισχυτών
RASSF8	114	TSS +4158	F: TTGCATGGTAACCAGACATCA R: TTCTAGGTGGCTCCCCTTTT
		TSS +84318	F: TGTCTTGGCATAAGGGTAGAGG R: GCGCAGGTTACTGATGTGC
NFAT5	139	TSS +796	F: CCGCGTCTTCTCTTACCG R: GTGACCCTGCACTCAGAACC
		TSS +85464	F: TCTTGATGATTAAGGCAACAACCTT R: GGCTTAAACCTGGCTCTAATGTT
SIK3	255	TSS +725	F: TCCCCCTTATTTCCCCATT R: GATCCCGAGGAGACACGAT
		TSS +252175	F: TCATTATGCTGACCGGAGGT R: CTTCATAGCGACAGAAGTGAGC
STK3	371	TSS +1428	F: CACCACAGAATTGCTGCCTA R: AGAGAATCCTTGCCCTTG TG
		TSS +80382	F: AACTGGATTTGTGAGTGTCTTTCT R: TATGCAAAGCTACCCCAAA
LMAN2	20	TSS +1300	F: TCCAGGTGAAAAGAGTCAAGTACA R: CCAGCTAGCAAATGTCATAAACA
		TSS + 19243	F: CCCTGGTCACAGGCTCTC R: GGGGTGGAGTGTGGGACT

Αποτελέσματα

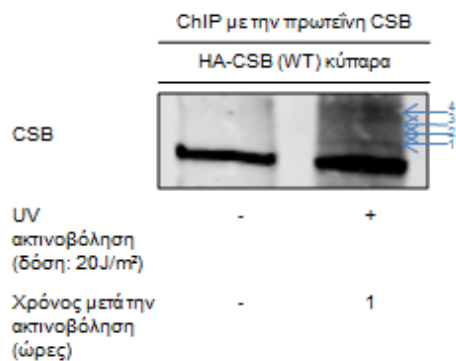
Σχεδιασμός υπόθεσης

Εφαλτήριο για την διαμόρφωση της υπόθεσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσαν οι αρχικές μελέτες ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με την πρωτεΐνη CSB, και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνικών ζωνών με την ίδια πρωτεΐνη (ChIP on Western) ύστερα από έκθεση φυσιολογικών ινοβλαστών του δέρματος σε UV-C ακτινοβολία. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι μεγάλο ποσοστό της CSB πρωτεΐνης που δεσμεύεται στη χρωματίνη είναι τροποποιημένη (Εικόνα 12). Η τροποποίηση αυτή ήταν εμφανής κυρίως μετά από χημική διασύνδεση των κυττάρων με φορμαλδεΰδη (Εικόνα 13). Η μετά-μεταφραστική τροποποίηση της CSB πρωτεΐνης φάνηκε να επάγεται μόνο μετά από έκθεση των κυττάρων σε τοξικούς παράγοντες (Εικόνα 12), ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι η τροποποίηση αυτή ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς απόκρισης του κυττάρου σε κυτταροτοξικούς παράγοντες.

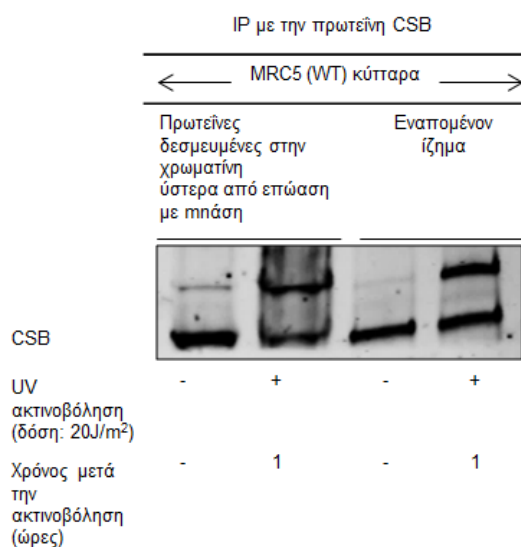
Επόμενο σημαντικό αποτέλεσμα για το σχεδιασμό της παρούσας μελέτης ήταν το πείραμα της Εικόνας 14, ένα πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με την πρωτεΐνη RNA πολυμεράση II (RNAPOLII) κατά το οποίο παρατηρήθηκε ότι η τροποποιημένη μορφή της CSB πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με την RNAPOLII μία ώρα μετά την ακτινοβολία. Η αλληλεπίδραση αυτή παύει να υφίσταται 22 ώρες μετά την ακτινοβολία, ένα χρονικό διάστημα κατά το οποίο αναμένεται να έχει επιτευχθεί επιδιόρθωση του DNA και επιστροφή το κυττάρου στην εύρυθμη λειτουργία (Εικόνα 14).

Βάσει των παραπάνω, διαμορφώθηκε η υπόθεση ότι η λειτουργία της CSB πρωτεΐνης ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά μετά από έκθεση των κυττάρων σε τοξικούς παράγοντες και πως η τροποποίηση αυτή φέρεται να παίζει ρόλο στην επιδιόρθωση βλαβών DNA που παρεμποδίζουν την πορεία της πολυμεράσης επιμήκυνσης και κατά συνέπεια στους μηχανισμούς απόκρισης του κυττάρου για τη διασφάλιση της γενωμικής ακεραιότητας.

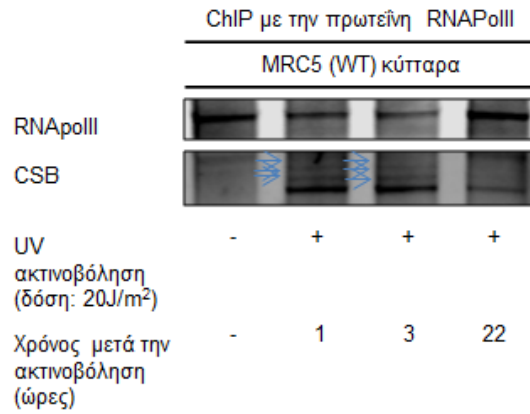
Για τα πειράματα τα οποία ακολουθούν χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρικές σειρές ελέγχου: i) η εδραιωμένη, εμπορικά διαθέσιμη κυτταρική σειρά ινοβλαστών του δέρματος CS1AN, η οποία προέρχεται από ασθενή με Cockayne Syndrome και είναι αθανατοποιημένη μέσω του ιού SV40, ii) η φυσιολογική κυτταρική σειρά HA-CSB (κύτταρα CS1AN-SV40, στα οποία έχει προστεθεί με τη βοήθεια πλασμιδίου η λειτουργική πρωτεΐνη CSB άγριου τύπου, η οποία και έχει σημανθεί με μια μικρή ακολουθία HA-tags καθώς και iii) η φυσιολογική κυτταρική σειρά/κύτταρα αγρίου τύπου, MRC5-SV40.



Εικόνα 12. Έλεγχος μετα-μετραφραστικών τροποποιήσεων της CSB πρωτεΐνης ύστερα από έκθεση φυσιολογικών κυττάρων σε UV ακτινοβολία. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε χημική διασύνδεση (crosslinking) με φορμαλδεΐδη. Επιτυγχάνεται με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης έναντι της πρωτεΐνης CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της ίδιας πρωτεΐνης.



Εικόνα 13. Έλεγχος μετα-μετραφραστικών τροποποιήσεων της CSB πρωτεΐνης ύστερα από έκθεση φυσιολογικών κυττάρων σε UV ακτινοβολία και κλασματοποίησή τους. Έγινε ανοσοκατακρήμνιση έναντι της πρωτεΐνης CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της ίδιας πρωτεΐνης.



Εικόνα 14. Έλεγχος αλληλεπίδρασης της CSB πρωτεΐνης με την RNAPOLII ως απόκριση των κυττάρων στην αναστολή της μεταγραφής. Επιτυγχάνεται με ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης έναντι της πρωτεΐνης RNAPOLII και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της πρωτεΐνης CSB. Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της πρωτεΐνης RNAPOLII χρησιμοποιείται για έλεγχο των ποσοτήτων (loading control).

Κεφάλαιο 1ο

Η πρωτεΐνη CSB τροποποιείται μετα-μεταφραστικά από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη ύστερα από έκθεση σε UV ακτινοβολία.

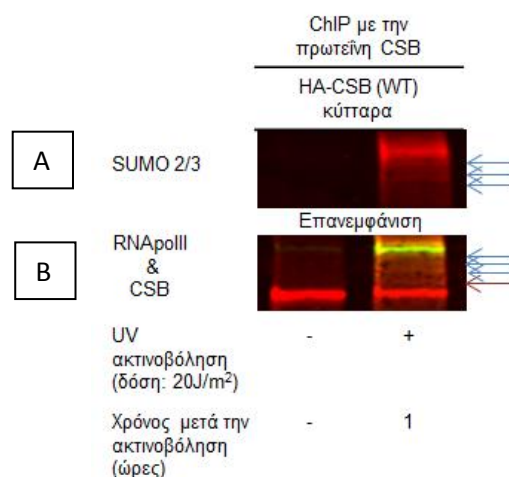
Χαρακτηρισμός της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης ως απόκριση σε έκθεση ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV-C)

Πρώτο σημαντικό βήμα αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης ως απόκριση σε κυτταροτοξικούς παράγοντες. Για τον έλεγχο και χαρακτηρισμό του μετα-μεταφραστικού τροποποιητή της CSB πρωτεΐνης ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο. Αρχικά, προκλήθηκαν βλάβες στο DNA φυσιολογικών κυττάρων, όπως τα 6-4 φωτοπροϊόντα (6-4 PP) και τα κυκλοβουτανικά διμερή θυμίνης (CPDs) που είναι γνωστό ότι απομακρύνονται μέσω του μηχανισμού TC-NER. Η πρόκληση τέτοιων βλαβών προκύπτει μέσω της έκθεσης των κυττάρων στην υπεριώδη (UV-C, 260 nm) ακτινοβολία του ήλιου.

Μετά την ακτινοβόληση και ύστερα από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα υπέστησαν χημική διασύνδεση “crosslinking” με τη χρήση φορμαλδεΐδης, ώστε να δημιουργηθούν δεσμοί μεταξύ πρωτεϊνών-DNA, πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-RNA. Έπειτα, η χρωματίνη των κυττάρων απομονώθηκε και υπεβλήθη σε τμηματοποίηση με τη χρήση υπερήχων (sonication). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση του εμπορικά διαθέσιμου αντισώματος α -CSB για ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης, ακολουθούμενη από πειράματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνικών ζωνών (Western Blot) με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων τροποποιήσεων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, φανέρωσε ως μια από τις επικρατέστερες τροποποιήσεις την SUMOυλίωση από τις πρωτεΐνες SUMO 2/3.

Στην Εικόνα 15, εμφανίζονται τα αποτελέσματα ύστερα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με την πρωτεΐνη CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης SUMO 2/3 (SUMO 2/3 antibody_Millipore_07-2167). Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 15A παρατηρείται θετικό σήμα SUMO 2/3 τροποποίησης σε χρωματίνη κυττάρων μετά από UV ακτινοβόληση (20 J/m^2) και η οποία έχει καταβυθιστεί με το CSB αντίσωμα. Το σήμα αυτό αντικατοπτρίζει πρωτεΐνη

μοριακού μεγέθους αντίστοιχου της τροποποιημένης CSB πρωτεΐνης. Για επιπρόσθετη επιβεβαίωση, οι μεμβράνες επανεπλώστηκαν, αυτήν τη φορά με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CSB, και στην Εικόνα 15B παρουσιάζεται η ακριβής συνεντόπιση των τροποποιημένων ζωνών. Ως εκ τούτου, είναι εύλογο να συμπεραθεί ότι η πρωτεΐνη CSB τροποποιείται μετα-μεταφραστικά από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη ύστερα από έκθεση σε UV ακτινοβολία.

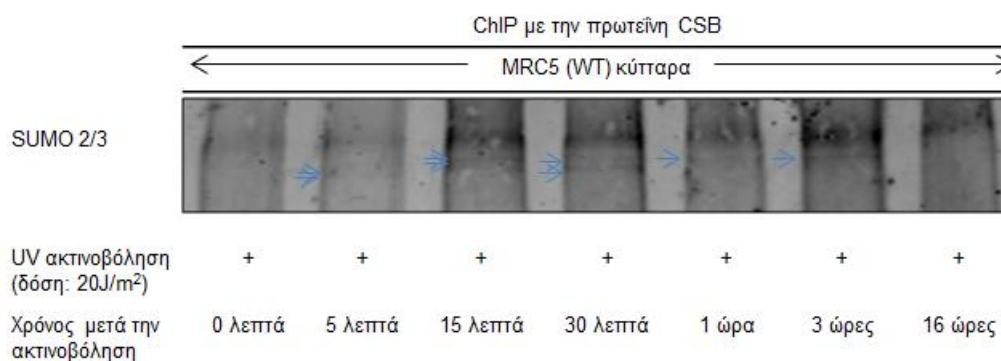


Εικόνα 15. Χαρακτηρισμός της SUMO πρωτεΐνης ως ο μετα-μεταφραστικός τροποποιητής της CSB πρωτεΐνης για την απόκριση σε κυτταροτοξικούς παράγοντες. Επιτυγχάνεται δια της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης έναντι της πρωτεΐνης CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι Α) της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης SUMO και Β) επιβεβαιώνεται μετά από ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της ίδιας πρωτεΐνης CSB.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα άνωθεν αποτελέσματα, που απεικονίζουν ένα μέρος της CSB πρωτεΐνης να τροποποιείται, είναι ενδεικτικά του “SUMO αινίγματος”, χαρακτηριστικού της SUMO τροποποίησης, όπου όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της εισαγωγής, μόνο ένα μικρό μέρος μιας πρωτεΐνης αρκεί να SUMOυλιωθεί για να επιτευχθεί μέγιστο αποτέλεσμα.

Επιπρόσθετο χαρακτηριστικό της SUMO τροποποίησης, το οποίο επιβεβαιώθηκε από μία σειρά πειραμάτων που έλαβαν χώρα μετά την ακτινοβολία φυσιολογικών ινοβλαστών του δέρματος και επώαση για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ήταν το γεγονός ότι πρόκειται για μια τροποποίηση που λαμβάνει χώρα άμεσα μετά το ερέθισμα. Συγκεκριμένα, όπως είναι εμφανές από τα αποτελέσματα του πειράματος ChIP on Western της Εικόνας 16, κατά το οποίο πραγματοποιείται ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με την πρωτεΐνη CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση ζωνών με την χρήση του αντισώματος SUMO 2/3,

παρατηρείται η τροποποίηση της CSB πρωτεΐνης από την SUMO πρωτεΐνη να λαμβάνει χώρα ήδη από τα πρώτα 5 λεπτά.



Εικόνα 16. Χρονική επισκόπηση της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης από την SUMO πρωτεΐνη. Επιτυγχάνεται δια της ανοσοκατακρήμνισης χρωματινής έναντι της πρωτεΐνης CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης SUMO για διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Σημείωση κεφαλαίου: Ένας αριθμός τροποποιήσεων ελέγχθηκε, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ουβικιτινίωσης και της SUMOυλίωσης. Εξ αυτών, τα πιο διακριτά και σημαντικά αποτελέσματα προέκυψαν κατά την διάρκεια ελέγχου της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη τα οποία και παρουσιάζονται παραπάνω.

Διερεύνηση των πιθανών θέσεων της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης και δημιουργία της τριπλά μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η διερεύνηση των πιθανών θέσεων που λαμβάνουν χώρα οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, δεδομένης της ύπαρξης ενός συντηρημένου μοτίβου SUMO δέκτη (ψΚχΕ), που αποτελείται από **ψ**: ένα υδροφοβικό αμινοξύ (συνήθως μία ισολευκίνη, λευκίνη ή βαλίνη), **Κ**: μία λυσίνη με την οποία συνδέεται η SUMO πρωτεΐνη, **χ**: ένα ακόμα αμινοξύ και **Ε**: ένα γλουταμικό οξύ, έγινε έλεγχος της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης CSB για την ύπαρξη του μοτίβου αυτού. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν και με την χρήση ειδικών λογισμικών (όπως το GPS-SUMO, το SUMOplot, το JASSA και το PHOSIDA: ειδικές βάσεις δεδομένων για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις) με *in silico* screening για την σύγκριση της σπουδαιότητας

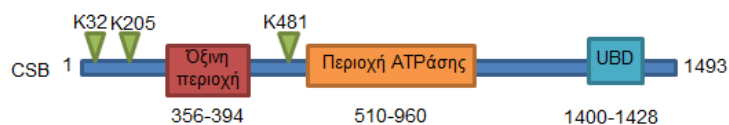
των ευρημάτων.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 17, στην αμινοξική αλληλουχία της CSB πρωτεΐνης αναγνωρίστηκαν 10 θέσεις με μερικώς συντηρημένο το μοτίβο ψKχE και τρεις θέσεις με πλήρως συντηρημένο μοτίβο, στις οποίες δύναται να λαμβάνουν χώρα SUMO τροποποιήσεις. Έτσι, για τη δημιουργία ενός επιτυχημένου CSB^{ΔSUMO} μεταλλάγματος επιλέχθηκαν οι 3 αυτές συντηρημένες πιθανές θέσεις τροποποίησης πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των λυσινών (τριπλετών), της cDNA αλληλουχίας του CSB γονιδίου στις θέσεις 32, 205 και 481 σε αλανίνες όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι Ι2». Η μεταλλαξιγένεση έγινε διαδοχικά για τις τρεις θέσεις, ώστε το τελικό cDNA που προέκυψε να κωδικοποιεί την τριπλά μεταλλαγμένη πλέον CSB πρωτεΐνη, CSB^{ΔSUMO} (Εικόνα 18). Ο λόγος για τον οποίο αποφασίστηκε να μεταλλαχθούν και οι 3 πιθανές θέσεις τροποποίησης από την SUMO πρωτεΐνη ήταν για να επιτευχθεί ολοκληρωτική έλλειψη της τροποποίησης. Πιο αναλυτικά, είναι γνωστό στη διεθνή επιστημονική κοινότητα ότι σε περίπτωση μετάλλαξης μίας μόνο λυσίνης, το κύτταρο SUMOυλιώνει εναλλακτικά μία άλλη κοντινή λυσίνη, η οποία πληρεί τις προϋποθέσεις. Όποτε για να απεμπολισθεί η συγκεκριμένη πιθανότητα, αποφασίστηκε η δημιουργία τριπλού μεταλλάγματος.

CSB protein: 13 hits by pattern (xxxKxExxx)

29-38	maiKqEsggd
202-211	aevKiEldha
252-261	ipqKqEkkpr
320-329	vlsKkEerlk
321-330	lskKEerlkK
478-487	kriKIEddse
603-612	ythKkEklir
756-765	lpdKnEqvf
1069-1078	seeKsEakga
1153-1162	lsyKrErpsq
1213-1222	rdaKfEgtri
1236-1245	senKsEakeq
1356-1365	gimKkEgkdn

Εικόνα 17. Αποτέλεσμα της *in silico* ανάλυσης για εύρεση των πιθανών θέσεων της SUMOυλίωσης στην CSB αμινοξική αλληλουχία



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση του CSB^{ΔSUMO} κύτταρα μεταλλάγματος.

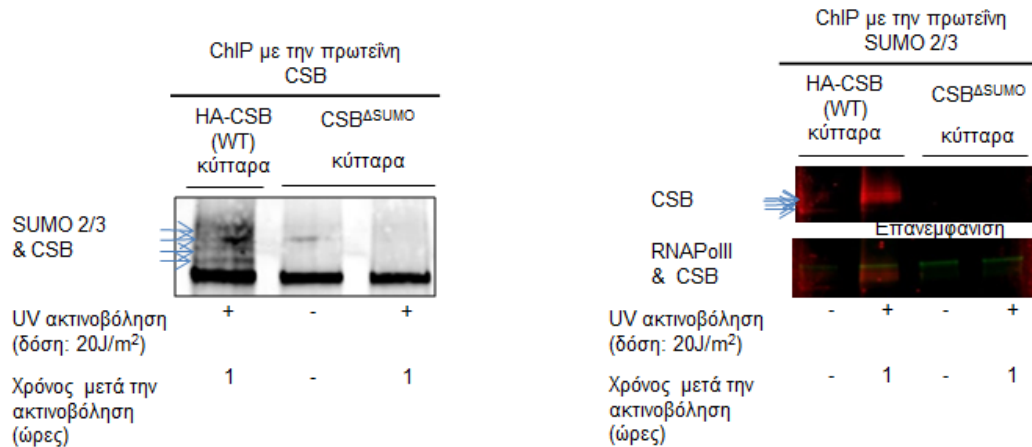
Ενδιαφέρον αποτέλεσε το γεγονός ότι και οι 3 λυσίνες, πιθανές θέσεις τροποποίησης από την SUMO πρωτεΐνη, βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο της CSB πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια του πρωτοκόλλου, το πλασμίδιο με το τριπλά μεταλλαγμένο CSB cDNA, το οποίο περιείχε και ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό geneticin (G418), εισήχθη μέσω μόνιμης διαμόλυνσης “stable transfection” σε κύτταρα της γονικής σειράς CS1AN-SV-40, τα οποία δεν έφεραν άλλη λειτουργική CSB πρωτεΐνη (CSB^{-/-}).

Έλεγχος της ικανότητας SUMOυλίωσης της τριπλά μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης

Ύστερα από επιλογή των θετικών κλώνων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο σε G418, τα κύτταρα που έφεραν το πλασμίδιο δοκιμάστηκαν με την τεχνική CHIP on Western για την ικανότητα τους να εκφράζουν την μεταλλαγμένη CSB πρωτεΐνη (CSB^{ΔSUMO}) και για το κατά πόσο είχαν πλέον την δυνατότητα τροποποίησης της από την SUMO πρωτεΐνη σε απόκριση UV ακτινοβολίας, συγκρίνοντας τα με τα γονικά κύτταρα CSB^{-/-} (CS1AN-SV40) και τα φυσιολογικά κύτταρα HA-CSB. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 19A, ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της SUMO τροποποίησης και της πρωτεΐνης CSB, τα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα **εκφράζουν τη μη τροποποιημένη πρωτεΐνη CSB σε αντίστοιχο επίπεδο** με τα HA-CSB κύτταρα. Παρ’ολ’αυτά, παρατηρείται ότι μετά από ακτινοβόληση (20 J/m²), η πρωτεΐνη CSB που εκφράζουν τα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα **δεν τροποποιείται**. Στο πείραμα αυτό, συγκρίθηκε η ανοσοκατακρημισμένη CSB πρωτεΐνη από ίδιο αριθμο (20*10⁷) κυττάρων CSB^{ΔSUMO} και HA-CSB. Επιβεβαίωση του παραπάνω πειράματος αποτέλεσε το αντίστροφο πείραμα (Εικόνα 19B), δηλαδή κατόπιν ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης έναντι της τροποποίησης SUMO και μετέπειτα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνικών ζωνών

έναντι της πρωτεΐνης CSB. Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της πρωτεΐνης RNAPOLII (με πράσινο χρώμα) αποδεικνύει ότι τα δείγματα ενδιαφέροντος έχουν ισοφορτωθεί. Συμπερασματικά, τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η **CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνη που φέρει μεταλλάξεις στα 3 διατηρημένα μοτίβα SUMO εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Παρόλα αυτά, αντίθετα με την φυσιολογική μη μεταλλαγμένη CSB πρωτεΐνη δεν μπορεί να SUMOυλιωθεί *in vivo*.**



Εικόνα 19. Έλεγχος της ικανότητας SUMOύλιωσης της **τριπλά μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης** 8A) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης έναντι της πρωτεΐνης CSB και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της SUMO τροποποίησης και της πρωτεΐνης CSB και 8B) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης έναντι της τροποποίησης SUMO και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της πρωτεΐνης CSB. Η πρωτεΐνη RNAPOLII (με πράσινο) χρησιμοποιείται ως δείκτης ισοφορτώματος των ακτινοβολημένων κυττάρων. Αποδεικνύεται ότι το μετάλλαγμα εκφράζει την CSB πρωτεΐνη και ότι πλέον δεν διαθέτει την δυνατότητα τροποποίησης από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη.

Κεφάλαιο 2^ο

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των πιθανών θέσεων τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη επιφέρει στα κύτταρα υψηλή ευαισθησία στην UV ακτινοβολία και μειωμένη επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά την ακτινοβόληση.

Έλεγχος της επίδρασης της έλλειψης της SUMOύλιωσης της CSB πρωτεΐνης στην βιωσιμότητα των κυττάρων και τη δημιουργία αποικιών μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου Cockayne είναι τα αυξημένα επίπεδα κυτταρικής απόπτωσης που προκαλείται από βλάβες στο DNA, ύστερα από έκθεση σε γενετοξικό στρες. Για να ελεγχθεί η ενδεχόμενη επίπτωση της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης των θέσεων τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη, στην βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και στην ικανότητα των κυττάρων αυτών για δημιουργία αποικιών, συγκεκριμένες μελέτες ελέγχου (viability και clonogenic survival assays) έλαβαν χώρα.

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων προς σύγκριση έγινε 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση με δόση UVC ακτινοβολίας 20 J/m². Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται ο τρόπος υπολογισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς και το αποτέλεσμα του ελέγχου. Συγκρίνοντας λοιπόν τα ποσοστά βιωσιμότητας των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων με τα κύτταρα αγρίου τύπου και τα κύτταρα ασθενών με Cockayne, παρατηρείται **σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων** με ποσοστά σχεδόν υποτετραπλάσια των κυττάρων αγρίου τύπου.

Αντιστοίχως, στην Εικόνα 21, συγκρίνεται η ικανότητα των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων, CSB^{-/-} κυττάρων (κυττάρων ασθενών με CS) καθώς και των φυσιολογικών HA-CSB κυττάρων, να πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν αποικίες, 14 μέρες μετά από ακτινοβόληση (με UVC δόση 2.5, 5 και 7.5 J/m²). Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα να έχουν σαφώς μειωμένη ικανότητα δημιουργίας αποικιών σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, με ποσοστά που πλησιάζουν εξαιρετικά εκείνα των CSB^{-/-} κυττάρων. Αξίζει να παρατηρηθεί ότι, το φαινόμενο υπήρξε όσο-εξαρτώμενο, δηλαδή αυξανόμενης της ακτινοβολίας

παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επίδραση στην ικανότητα δημιουργίας αποικιών.

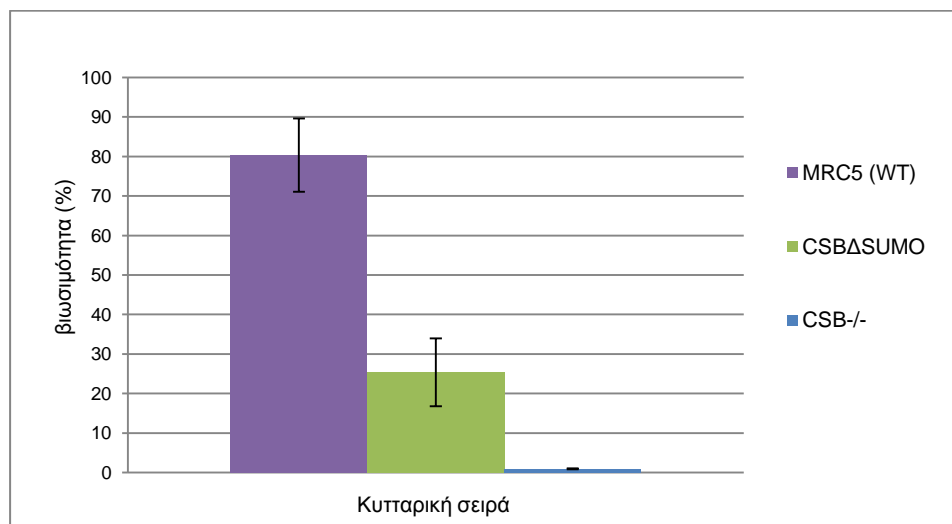
Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι, εκτός των άνωθεν πειραμάτων, κατά την διάρκεια μεταγενέστερων πειραμάτων, παρατηρήθηκαν επιπρόσθετα αποπτωτικά χαρακτηριστικά. Τέτοια ήταν μορφολογικά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα το παραμορφωμένο σχήμα των πυρήνων των CSB^{ΔSUMO} κύτταρων με παρουσία χαρακτηριστικών εξογκωμάτων (blebbing of nuclei) καθώς και η χαρακτηριστική μείωση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, όπως είναι η λαμίνη B1 λόγω διάσπασης.

Καταλήγοντας, από τα παραπάνω είναι εύλογο να συμπεραθεί ότι, η **απώλεια της ικανότητας της CSB πρωτεΐνης να SUMOυλιώνεται προσέδωσε στα κύτταρα μεγάλη ευαισθησία στην UV ακτινοβολία.**

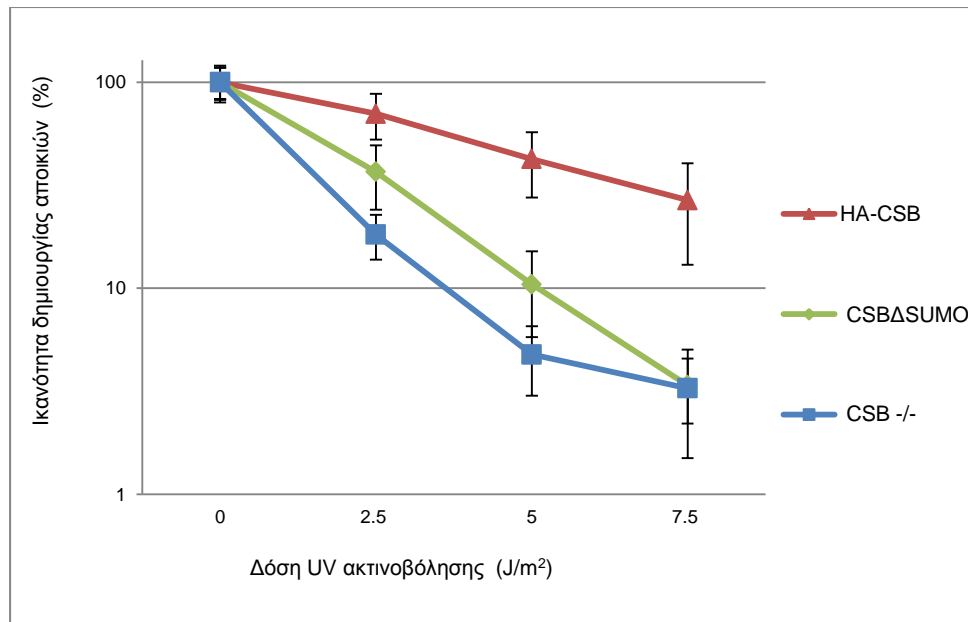
A)

$$\text{βιωσιμότητα} = \frac{\frac{\text{αριθμός ζωντανών ακτινοβολημένων κυττάρων}}{\text{αριθμός ζωντανών και νεκρών ακτινοβολημένων κυττάρων}}}{\frac{\text{αριθμός ζωντανών μη ακτινοβολημένων κυττάρων}}{\text{αριθμός ζωντανών και νεκρών μη ακτινοβολημένων κυττάρων}}} * 100$$

B)



Εικόνα 20. A) Τρόπος υπολογισμού βιωσιμότητας κυττάρων και B) αποτελέσματα πειράματος έλεγχου βιωσιμότητας φυσιολογικών (MRC5, WT μωβ), τριπλά μεταλλαγμένης κυτταρικής σειράς (CSBΔSUMO , πράσινο) και κυτταρικής σειράς ασθενών με Cockayne Syndrome (CSB-/-, μπλε), 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση με UVC δόση 20 J/m².

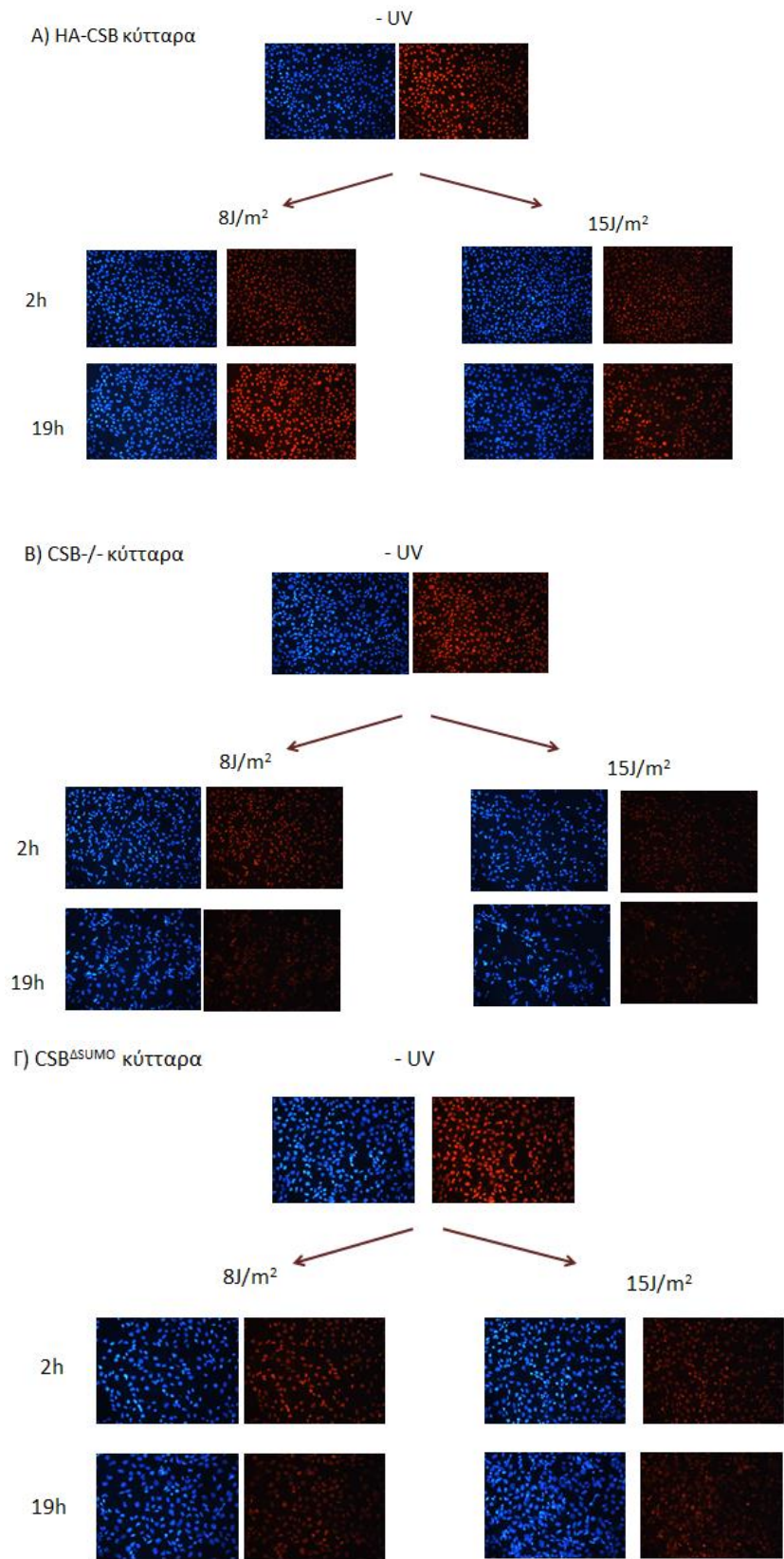


Εικόνα 21. Αποτέλεσμα πειράματος έλεγχου δημιουργίας αποικιών, 14 μέρες μετά την ακτινοβόληση με διαφορετικές δόσεις UVC ακτινοβολίας (2.5 J/m², 5 J/m², 7.5 J/m²). Απεικονίζονται οι κυτταρικές σειρές: HA-CSB με κόκκινο, η CSBASUMO με πράσινο και η CSB-/- με μπλε χρώμα.

Έλεγχος της επίδρασης της έλλειψης της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία

Το δεύτερο κύριο χαρακτηριστικό των CSB^{-/-} κυττάρων, δηλαδή κυττάρων που κωδικοποιούν μη λειτουργική CSB πρωτεΐνη και προέρχονται από ασθενείς με σύνδρομο Cockayne, είναι η μη επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Έτσι, κρίθηκε σημαντική η μελέτη της σύνθεσης του RNA στην τριπλά μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά για τη μελέτη ενός ενδεχόμενου ρόλου των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης CSB από την SUMO στην σύνθεση του RNA ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα πειράματα αυτά περιελάμβαναν τη χρήση του παραλλαγμένου νουκλεοτιδίου EU και της ισχυρής κλικ-ιτ χημείας, για τη μελέτη της σύνθεσης του νεοσυντιθέμενου RNA, μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Οι κυτταρικές σειρές προς σύγκριση ήταν το τριπλό μετάλλαγμα CSB^{ΔSUMO}, η φυσιολογική κυτταρική σειρά HA-CSB, και η CSB^{-/-}. Στην Εικόνα 22 παρουσιάζεται ένα δείγμα εικόνων σημασμένων πυρήνων μετά από την ενσωμάτωση του EU αναλόγου. Υψηλότερη σήμανση σηματοδοτεί μεγαλύτερη ενσωμάτωση του EU



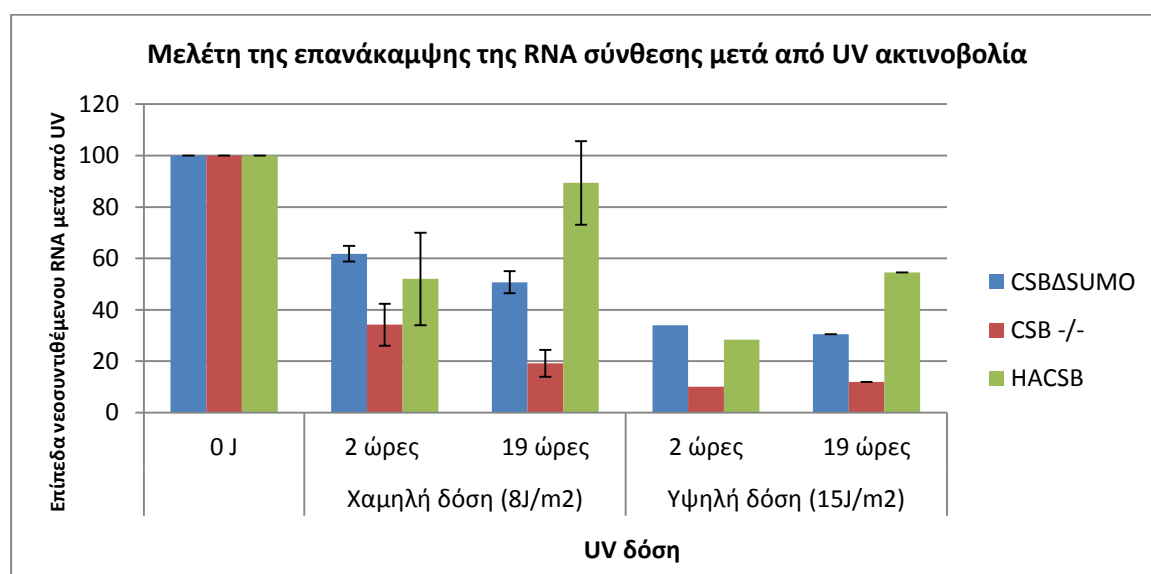
Εικόνα 22. Δείγμα εικόνων σημασμένων πυρήνων μετά από την ενσωμάτωση του EU αναλόγου (με κόκκινο) και της χρωστικής DAPI (με μπλε).

αναλόγου και άρα αυξημένη σύνθεση RNA. Τα αποτελέσματα από την επεξεργασία του

πειράματος αυτού παρουσιάζονται στην Εικόνα 23. Για στατιστικούς λόγους, κρίνεται σκόπιμο να σημειωθεί ότι, το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές με 2 ανεξάρτητους πληθυσμούς κυττάρων (2 καλυπτρίδες) κάθε φορά και φωτογραφίες πάρθηκαν από 3 διαφορετικά σημεία των καλυπτρίδων.

Όπως ήταν αναμενόμενο, δύο ώρες μετά την ακτινοβόληση και στις 3 κυτταρικές σειρές υπάρχει μείωση της σύνθεσης του RNA. Παρατηρείται μάλιστα, αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της δόσης της UV ακτινοβολίας και της σύνθεσης του RNA, καθώς, αυξανόμενη της δόσης της UV ακτινοβολίας μειώνεται η σύνθεση του RNA. Επιπροσθέτως, φαίνεται πως στα φυσιολογικά κύτταρα επανακάμπτεται η σύνθεση του RNA 19 ώρες μετά την ακτινοβόληση στα 8 J/m^2 . Αντιθέτως, φαίνεται ότι λόγω του ελαττωματικού μηχανισμού TC-NER, τα κύτταρα ασθενών με CS είναι υπερευαίσθητα στην ακτινοβολία UV και παρουσιάζουν μειωμένη επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά από έκθεση σε UV. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν δεδομένα γνωστά από την βιβλιογραφία.

Από την άλλη μεριά, είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται ο ρόλος της SUMΟύλιωσης της CSB πρωτεΐνης για την επανάκαμψη της σύνθεσης του RNA μετά από UV ακτινοβολία. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι η σύνθεση του RNA **δεν επανακάμπει** 19 ώρες μετά την ακτινοβόληση όπως αντίστοιχα συμβαίνει στα CSB-/- κύτταρα, καθιστώντας έτσι την λειτουργία της **SUMΟύλιωσης της CSB πρωτεΐνης απαραίτητη για την επανάκαμψη της μεταγραφής μετά από UV ακτινοβολία.**



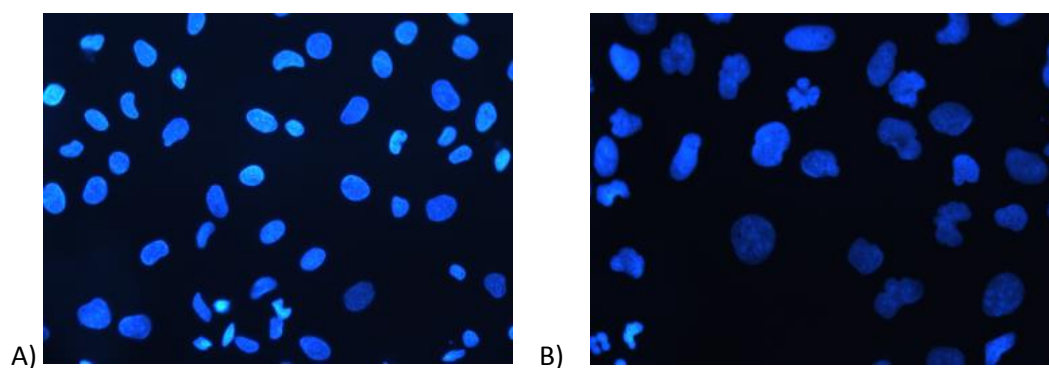
Εικόνα 23. Αποτελέσματα της μελέτης της επανάκαμψης της RNA σύνθεσης μετά από UV ακτινοβολία.

Κεφάλαιο 3^ο

Η έλλειψη της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης οδηγεί σε ανικανότητα ολοκλήρωσης της S φάσης του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων και εισόδου στην G2/M. Η ανικανότητα αυτή συνοδεύεται από / ή είναι αποτέλεσμα της αυξημένης συσσώρευσης της πρωτεΐνης ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου της φωσφορυλιωμένης cdc2 κινάσης

Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ύστερα από έκθεση των κυττάρων σε UV-C ακτινοβολία.

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης των πειραμάτων μελέτης της επανάκαμψης της σύνθεσης RNA μετά από έκθεση σε κυτταροτοξικούς παράγοντες παρατηρήθηκε ότι, 19 ώρες μετά από την ακτινοβόληση, ένας μεγάλος αριθμός μεταλλαγμένων CSB^{ΔSUMO} κυττάρων πέθαιναν, ενώ οι πυρήνες των κυττάρων που έμεναν προσδεδεμένα (attached) στα τριβλία παρουσίαζαν μη ομαλή μορφολογία σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα HA-CSB (Εικόνα 24). Συγκεκριμένα, ήταν εμφανές ότι οι πυρήνες των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων δεν είχαν πλέον το φυσιολογικό ελλειψοειδές -σχεδόν κυκλικό- σχήμα, αλλά παρουσίαζαν πολλαπλά εξογκώματα.



Εικόνα 24. Δείγμα εικόνων σημασμένων πυρήνων α) HA-CSB και β) CSB^{ΔSUMO} κυττάρων 19 ώρες μετά την ακτινοβόληση με UVC δόση 15 J/m². Το μπλε χρώμα οφείλεται στην ενσωμάτωση της χρωστικής DAPI κατά την διεξαγωγή πειραμάτων.

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι, κατόπιν εκθέσεως σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, τα κύτταρα προχωρούν σε διακοπή του κύκλου τους (cell cycle arrest) έως

όπου διορθωθούν οι βλάβες στο DNA¹⁴⁹. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου συμβαίνει ώστε να διασφαλισθεί η γενωμική ακεραιότητα. Σημαντικό ρόλο για τη σηματοδότηση της διακοπής αυτής και την εύρυθμη μετάβαση του κυττάρου από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη κατόπιν επιδιορθωσης της βλάβης, διαδραματίζουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints). Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου λειτουργούν ανάμεσα στις κυτταρικές φάσεις και είναι ευρέως γνωστά ως σημεία ελέγχου G1/S, S και G2/M.

Διαμορφώθηκε λοιπόν η υπόθεση ότι οι πυρήνες των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων παρουσιάζουν διαφοροποιημένη δομή σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα λόγω πιθανών προβλημάτων στη ρύθμιση του κυτταρικού τους κύκλου. Για να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση αποφασίστηκε η χρήση του πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας ροής (Fluorescence-activated cell sorting –FACs), ώστε να διερευνηθούν και να συγκριθούν τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων υπό μελέτη. Η συλλογή δειγμάτων των MRC5, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων λάμβανε χώρα μετά την ακτινοβολήση κάθε 2 ώρες και για μέγιστο χρονικό διάστημα 50, 32 και 38 ωρών αντίστοιχα. Λόγω κυτταρικής απόπτωσης, η συλλογή των CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων έλαβε τέλος νωρίτερα από τα MRC5. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία κατά την οποία οι μετρήσεις γίνονται καθώς τα κύτταρα ρέουν ενώ βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε ένα διάλυμα. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση πολλαπλών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου καθώς αυτό περνάει από μια δέσμη φωτός.

Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται τα ιστογράμματα που προκύπτουν ύστερα από ανάλυση κάθε δείγματος στα λογισμικά FACSDiva (Version 6.0; BD Biosciences) και FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA). Στα ιστογράμματα αυτά απεικονίζεται η κατανομή των διαφορετικών δειγμάτων στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G0/G1, S και G2/M). Ήδη από τα ιστογράμματα και πριν την περαιτέρω ανάλυση, είναι εμφανείς οι διαφορές μεταξύ της κατανομής των φυσιολογικών κυττάρων και των κυττάρων CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου. Ιδιαίτερως εμφανής είναι η πρόοδος των φυσιολογικών κυττάρων από τα διαφορετικά σημεία ελέγχου/φάσεις του κυτταρικού κύκλου που εμφανίζεται σαν προοδευόν κύμα. Αντίθετα παρατηρείται απουσία τέτοιας προόδου στην κυτταρική σειρά CSB^{-/-} και καθυστερημένη και ανολοκλήρωτη αντίδραση των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων.

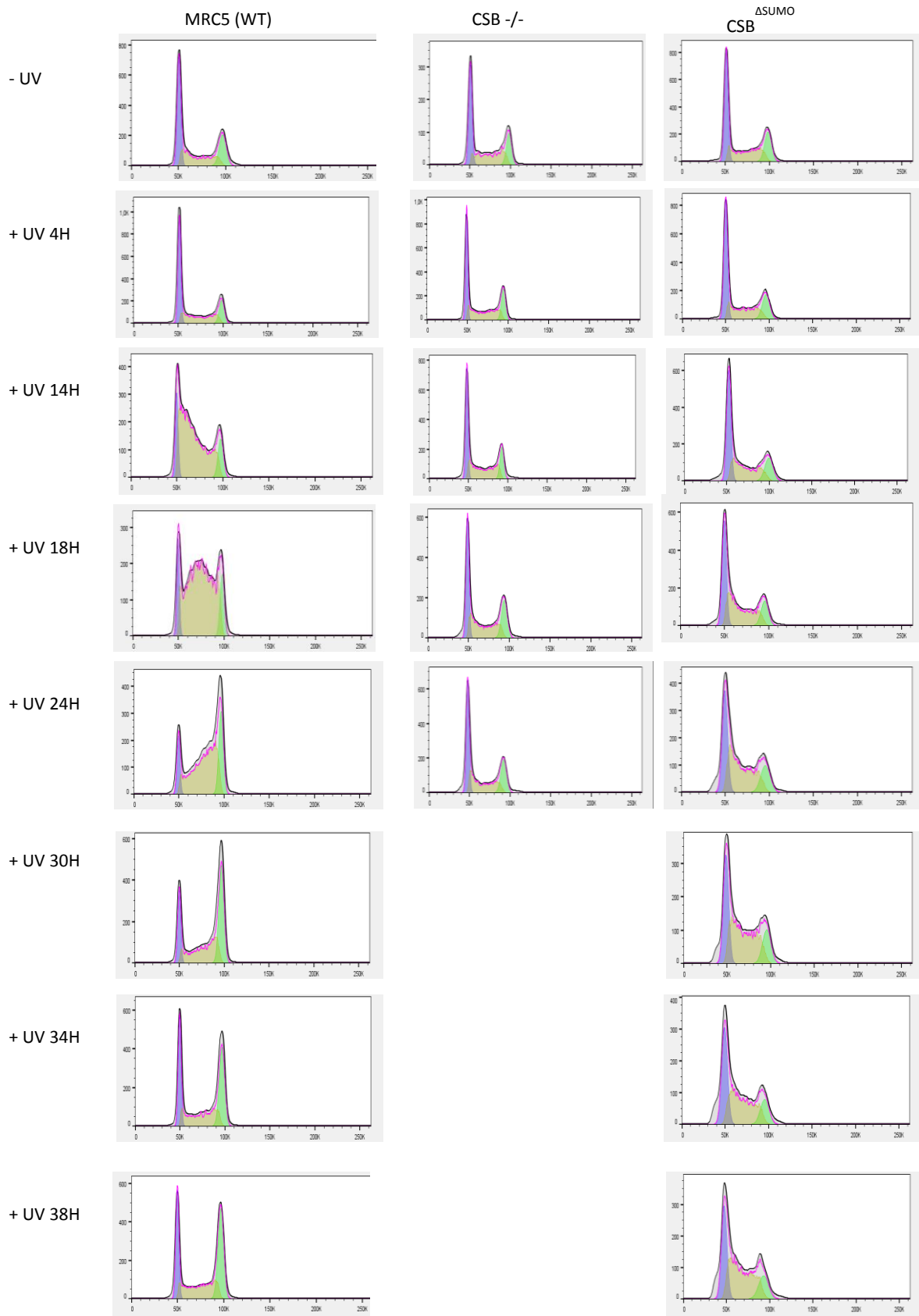
Η διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής του κυτταρικού κύκλου μετά από UV ακτινοβολία ανά κυτταρική σειρά (MRC5, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO}) παρουσιάζεται στην Εικόνα 26 ενώ ανά φάση κυτταρικού κύκλου (G0/G1, S και G2/M φάση) παρουσιάζεται στην

Εικόνα 27Α. Τα διάγραμμα αυτά επιβεβαιώνουν ότι, τα φυσιολογικά κύτταρα αμέσως μετά την ακτινοβόληση προχωρούν, όπως αναμένεται σύμφωνα με την βιβλιογραφία, σε παύση του κυτταρικού τους κύκλου (“cell cycle arrest”), ώστε να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος για να επιτευχθεί η επιδιόρθωση του DNA πριν το διπλασιασμό του. Ως αποτέλεσμα της παύσης του κυτταρικού κύκλου, παρατηρούμε ένα προοδούν κύμα με διαδοχική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην G0/G1, S και G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, είναι εμφανής η αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην G0/G1 φάση, κατά το χρονικό διάστημα 2-10 ώρες μετά την ακτινοβόληση καθώς και η διαδοχική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση 10-26 ώρες μετά την ακτινοβόληση και αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην G2/M κατά το χρονικό διάστημα 26-38 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά –από όσο δύναται να γνωρίζουμε- που πραγματοποιείται μια τέτοια διεξοδική μελέτη (αποτελέσματα κάθε 2 ώρες) ινοβλαστών δέρματος (SV-40 αθανατοποιημένων) μετά από ακτινοβόληση με UV-C σε κυτταρομετρητή ροής και που παρουσιάζεται με αναλυτικό τρόπο η πορεία διακοπής και μετέπειτα επανάκαμψης του κυτταρικού κύκλου. Το ίδιο αναλυτικά σε παράλληλο πείραμα παρουσιάζεται, η απουσία τέτοιου είδους «προοδούντος κύματος» σε κύτταρα ασθενών με CS. Τέλος, για πρώτη φορά παρουσιάζεται η επίδραση που έχει η απουσία της μεταμεταφραστικής τροποποίησης της CSB από την SUMO πρωτεΐνη στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μετά από UV ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται ένα τρίτο ενδιάμεσο προφίλ μεταξύ των φυσιολογικών και των κυττάρων ασθενών με CS με κύρια χαρακτηριστικά τα εξής:

A) παρατεταμένη παραμονή των κυττάρων στην G0/G1 φάση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα (14 ώρες παραμονή στα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα έναντι 10 ώρες στα φυσιολογικά κύτταρα)

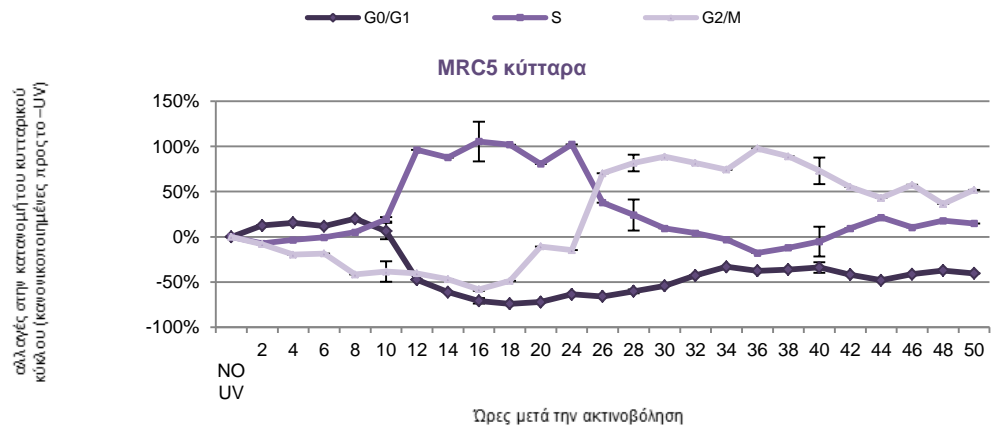
B) καθυστερημένη είσοδο και μειωμένη κατά πολύ αύξηση του αριθμού των κυττάρων που περνάνε στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (50% στα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα έναντι 100% στα φυσιολογικά κύτταρα) και

Γ) παντελή απουσία εισόδου στην G2/M φάση.

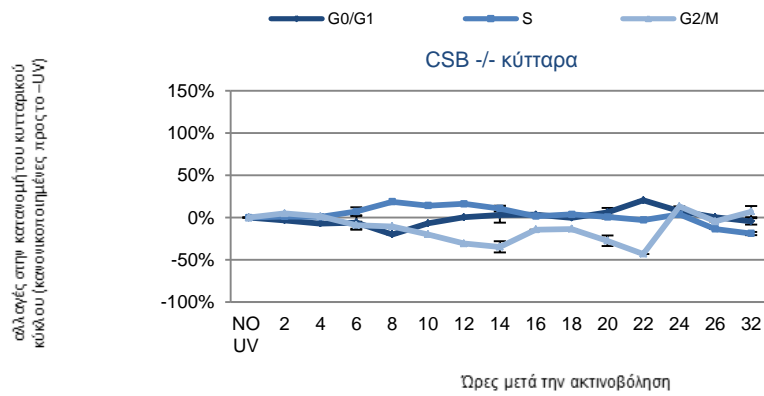


Εικόνα 25. Επίδραση της UV ακτινοβολίας στον κυτταρικό κύκλο φυσιολογικών κυττάρων (MRC5), κυττάρων ασθενών με CS (CSB^{-/-}) και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων. Συνολική απεικόνιση ιστογραμμάτων όπως εμφανίζονται στο λογισμικό Flowjo (Tree Star, Ashland, OR, USA). Με μωβ απεικονίζεται η G0/G1 φάση, με κίτρινο η S και με πράσινο η G2/M φάση.

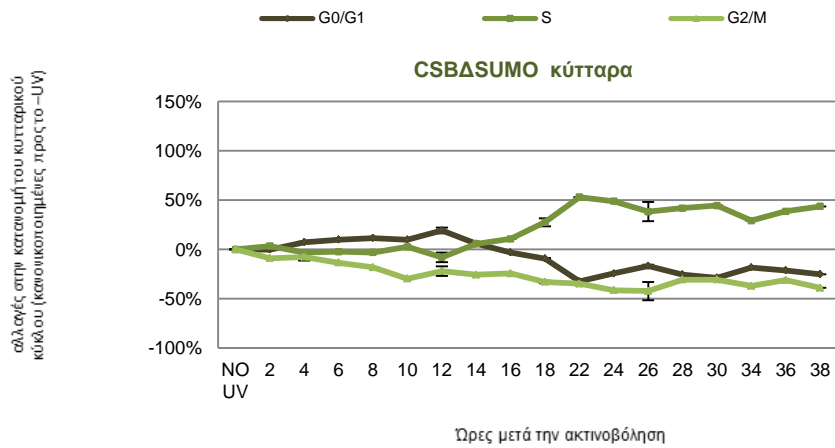
A



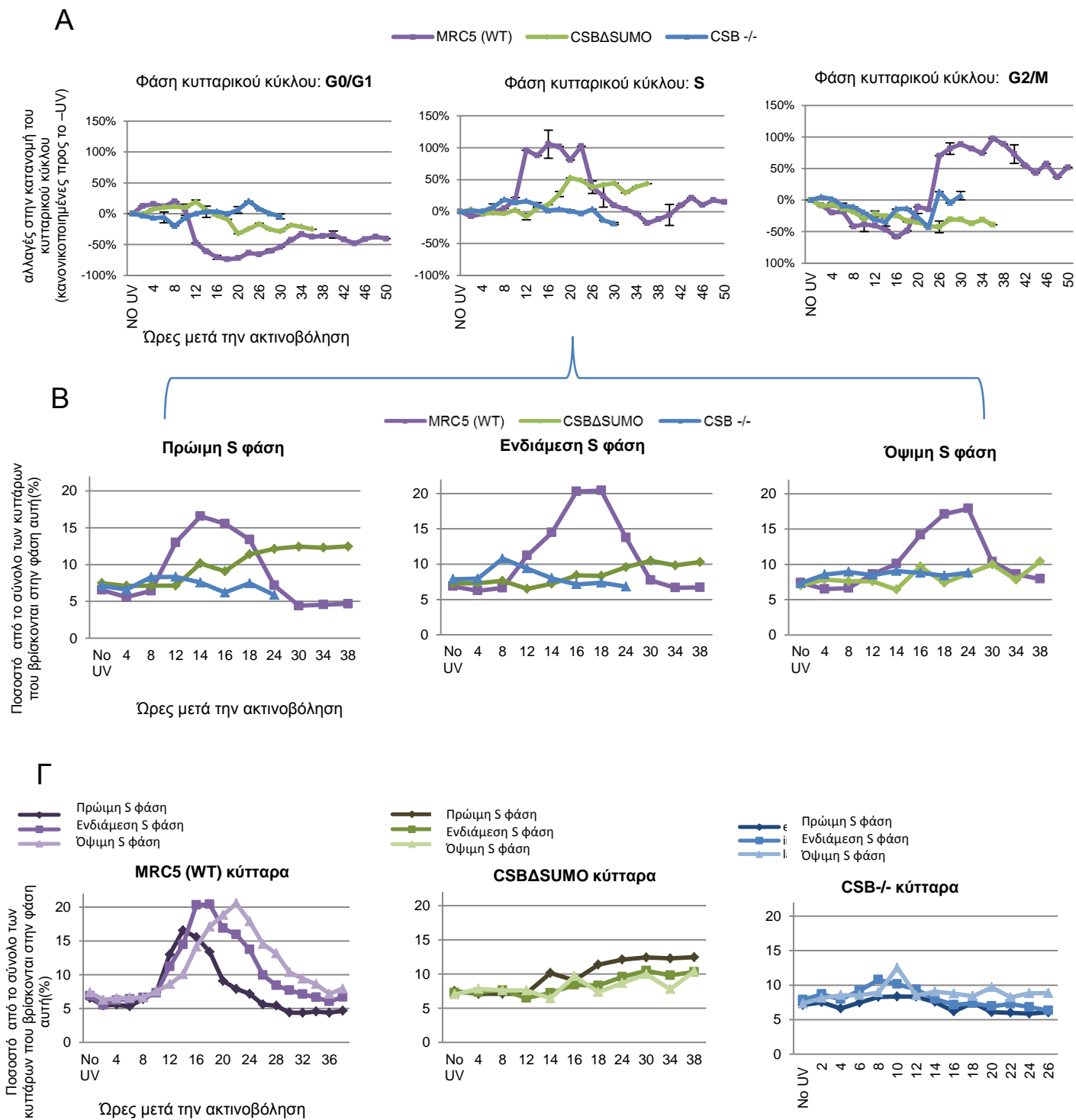
B



Γ



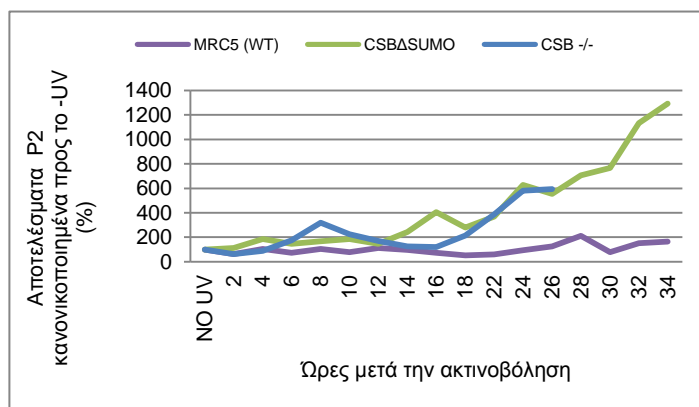
Εικόνα 26. Διαγραμματική απεικόνιση ανά κυτταρική σειρά (A) αγρίου τύπου MRC5, B) ασθενών με CS και Γ) CSB^{ΔSUMO}) της κατανομής του κυτταρικού κύκλου μετά από UV ακτινοβολία. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (standard error) που προέκυψε από τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Για κάθε χρονικό διάστημα >10000 κύτταρα αναλύθηκαν.



Εικόνα 27. Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των διαφορετικών κυτταρικών σειρών (MRC5, CSB -/- και CSB^{ΔSUMO}) ανά φάση κυτταρικού κύκλου (G0/G1, S και G2/M φάση) μετά από UV ακτινοβολία. Β) Χρονική τμηματοποίηση της S φάσης του κυτταρικού κύκλου σε πρώιμη, ενδιάμεση και όψιμη φάση και διαγραμματική ανάλυση του ποσοστού των διαφορετικών κυτταρικών σειρών (MRC5, CSB -/- και CSB^{ΔSUMO}) που βρίσκονται στις φάσεις αυτές. Γ) Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού ανά κυτταρική σειρά MRC5, CSB -/- και CSB^{ΔSUMO} που βρίσκονται σε πρώιμη, ενδιάμεση ή όψιμη φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (standard error) που προέκυψε από τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Για κάθε χρονικό διάστημα >10000 κύτταρα αναλύθηκαν.

Για την περαιτέρω ανάλυση της S φάσης του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε χρονικός διαχωρισμός της σε 3 διαστήματα/φάσεις, με χρήση του FlowJo λογισμικού. Στις Εικόνες 27B και 27Γ, παρουσιάζονται: i) η προοδευτική αύξηση των φυσιολογικών κυττάρων που βρίσκονται στην πρώιμη, ενδιάμεση και όψιμη S φάση, ii) η έλλειψη αντίστοιχης αύξησης στα CSB^{-/-} κύτταρα και iii) η αρχική αύξηση των CSB^{ΔSUMO} κύτταρων στην πρώιμη και σε μικρότερο ποσοστό στην ενδιάμεση φάση με απουσία αντίστοιχης αύξησης στην όψιμη S φάση.

Μάλιστα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, η απουσία προόδου του κυτταρικού κύκλου των CSB^{ΔSUMO} κύτταρων από την S στην G2/M φάση, συνοδεύεται με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων/ κυτταρικών υπολειμμάτων (P2).



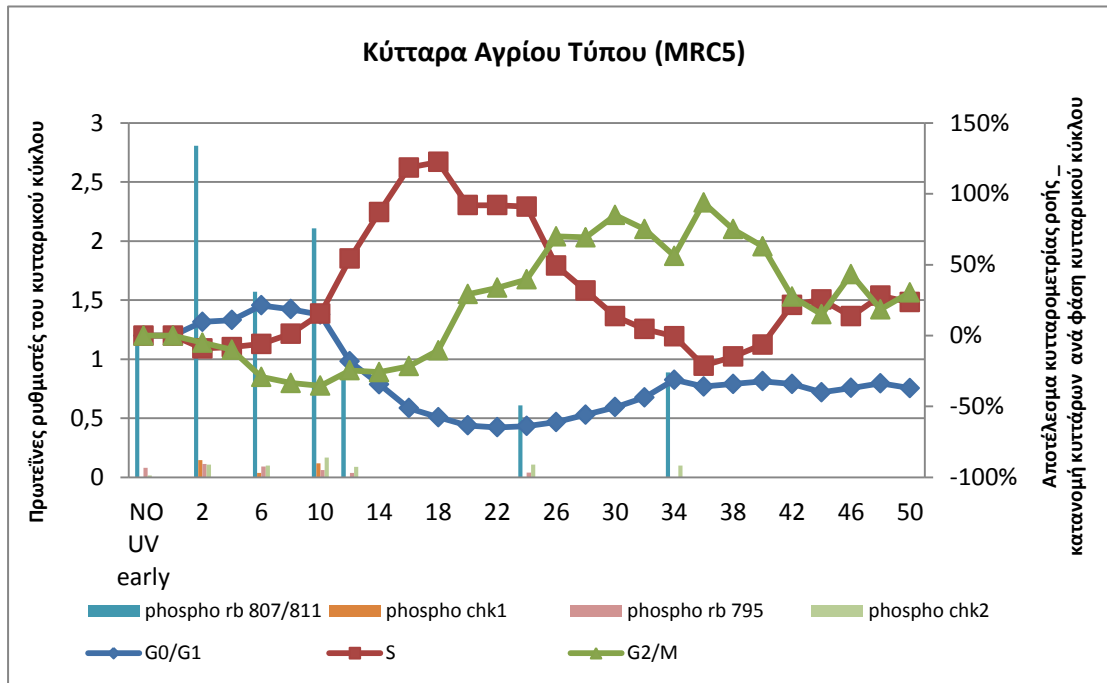
Εικόνα 28. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού P2 (το οποίο είναι ενδεικτικό των νεκρών κυττάρων και των κυτταρικών υπολειμμάτων των διαφορετικών κυτταρικών σειρών (MRC5, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO}) μετά από UV ακτινοβολία.

Έχοντας καταλήξει στο συμπέρασμα ότι, η έλλειψη της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης οδηγεί σε ανικανότητα των κυττάρων να ολοκληρώσουν την S φάση του κυτταρικού κύκλου και να εισέλθουν στην G2/M, θελήσαμε να διερευνήσουμε σε μεγαλύτερο βάθος την δυναμική του κυτταρικού κύκλου και πιο συγκεκριμένα την συμπεριφορά των γνωστών πρωτεϊνών-ρυθμιστών των διαφορετικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Πιο αναλυτικά, ελέγχθηκε η συμπεριφορά των φωσφορυλιωμένων μορφών των κάτωθι πρωτεϊνών: Rb (Ser 807/811 and Ser 795), Chk1 (Ser 345), Chk2 (Thr68), Cdc2 (Tyr 15).

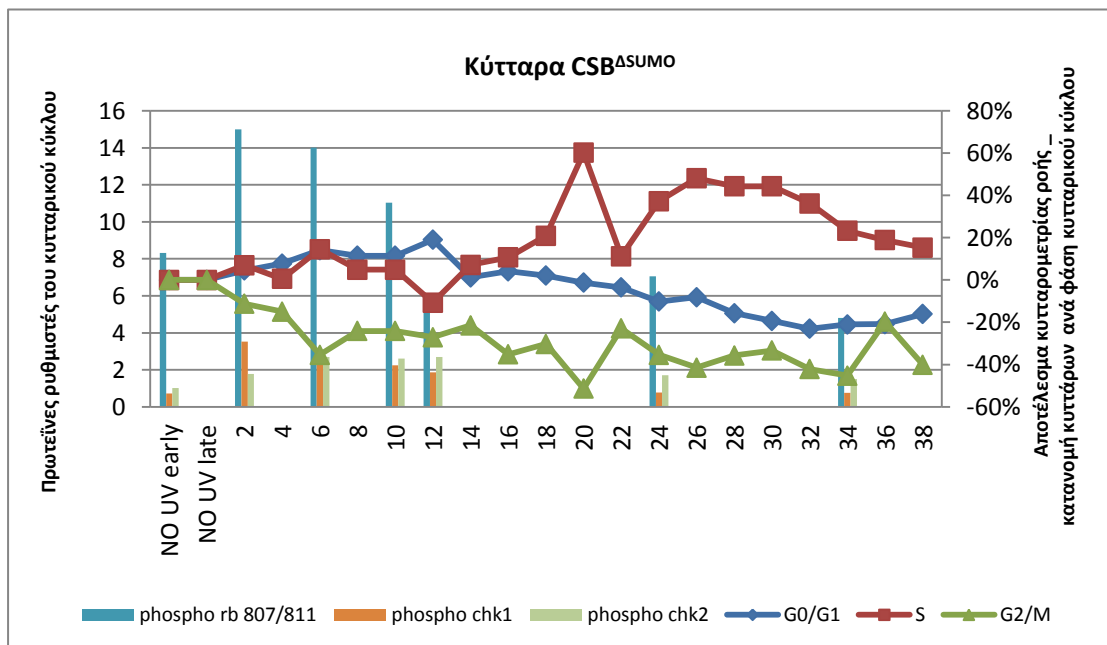
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η πρωτεΐνη retinoblastoma (Rb), είναι κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου της μετάβασης από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου¹⁵⁰. Κατά την πρώιμη και ενδιάμεση G1 φάση, η Rb συνδέεται και καταστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F¹⁵¹. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb από τις κινάσες CDKs κατά την όψιμη G1 φάση, έχουν ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της Rb από τον παράγοντα E2F και την μετάβαση στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η κινάση cdc2-cyclin b (γνωστή και ως CDK1) είναι καθοριστική για την ρύθμιση της μετάβασης του κυττάρου στην G2/M φάση^{152,153}. Συγκεκριμένα, όταν η κινάση cdc2-cyclin b φωσφορυλιώνεται κατά την G2 φάση από τις κινάσες Wee1 και Myt1, απενεργοποιείται και ο κυτταρικός κύκλος σταματάει. Αντίθετα όταν αποφωσφορυλιώνεται από τις φωσφατάσες CDC25, η κινάση ενεργοποιείται και ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζει¹⁵⁴. Η ύπαρξη βλαβών στο DNA, ενεργοποιεί τις κινάσες DNA-PK/ATM/ATR, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις κινάσες Chk1 και Chk2 και p53^{155,156}. Οι Chk κινάσες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες CDC25, αποτρέποντας την ενεργοποίηση της Cdc2, διευκολύνοντας έτσι την επιδιόρθωση του DNA.

Στην Εικόνα 29, παρατίθενται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων ενός εκ των χαρακτηριστικών πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης ζωνών ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων έναντι των πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Τα ραβδογράμματα αυτά εμφανίζονται σε συνάρτηση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής. Όπως είναι εμφανές, οι δύο κυτταρικές σειρές HA-CSB και CSB^{ΔSUMO}, δεν εμφανίζουν διαφορές ως προς την δυναμική φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Rb (Ser 807/811 and Ser 795), Chk1 (Ser 345) και Chk2 (Thr68). Μάλιστα, παρατηρείται η αύξηση της συσσώρευσης των μορφών αυτών, όπως αναμένεται κατά το χρονικό διάστημα πριν την μετάβαση στην S φάση του κυτταρικού κύκλου.

A)



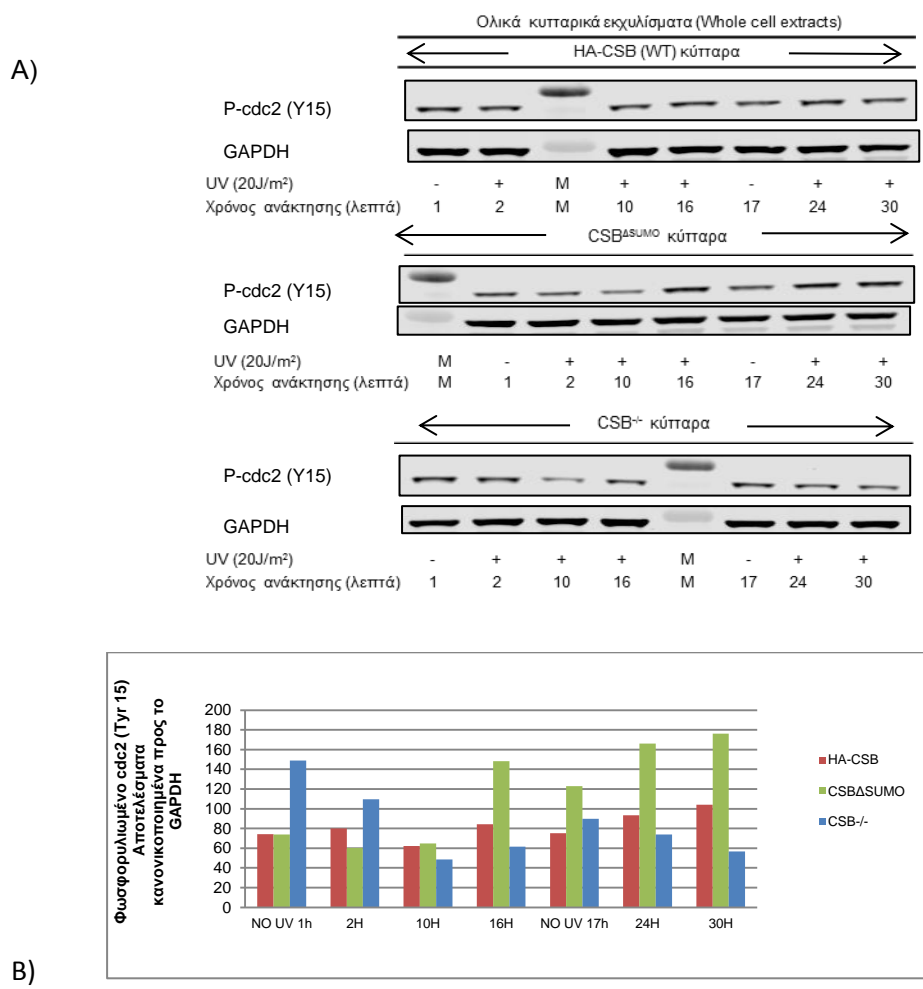
B)



Εικόνα 29. Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης ζωνών ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων A) HA-CSB και B) CSB^{ΔSUMO} κυττάρων έναντι των πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου με ταυτόχρονη παρουσίαση των αντίστοιχων αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής (βλ προηγούμενη παράγραφο).

Αντίθετα, στην εικόνα 30, όπου συγκρίνονται οι 3 κυτταρικές σειρές HA-CSB, CSB^{ΔSUMO} και CSB^{-/-}, παρατηρούνται διαφορές στην δυναμική συσσώρευσης της φωσφορυλιωμένης ανενεργής cdc2 κινάσης. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ανενεργής cdc2 στην κυτταρική σειρά CSB^{ΔSUMO} κατά το διάστημα 16, 24 και 30 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Τέτοια αύξηση δεν αναμένεται αλλά και δεν παρατηρείται στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στα κύτταρα HA-CSB.

Καταλήγοντας, βάσει των άνωθεν αποτελεσμάτων είναι εύλογο να συμπεραθεί ότι η ανικανότητα των CSB^{ΔSUMO} να εισέλθουν στην φάση της μίτωσης συνοδεύεται από / ή είναι αποτέλεσμα της αυξημένης συσσώρευσης της φωσφορυλιωμένης ανενεργής cdc2 κινάσης.



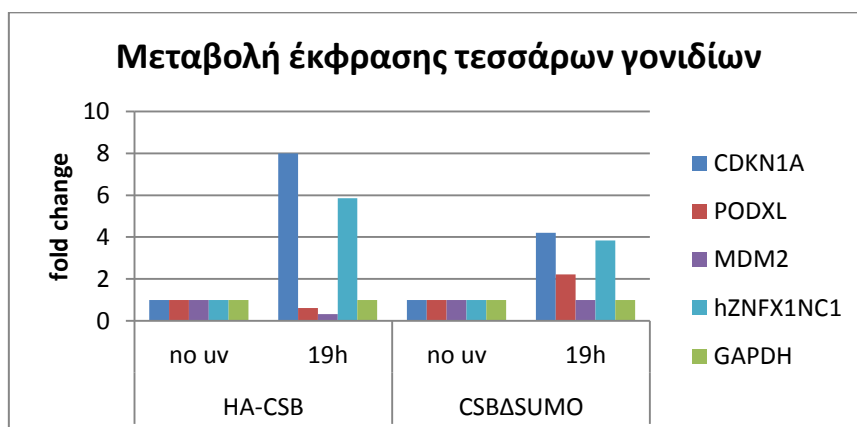
Εικόνα 30. A) Αποτελέσματα ανασοαποτύπωσης ζωνών κατά Western της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης; cdc2 (TYR15) ακτινοβολημένων και μη ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων των HA-CSB, CSB^{ΔSUMO} και CSB^{-/-} κυττάρων. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των δειγμάτων (loading control). Τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα B. Τα αποτελέσματα είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές εικόνες τουλάχιστον 2 πειραμάτων. Όπου M (= protein marker), ο δείκτης μοριακής μάζας.

Κεφάλαιο 4ο

Η έλλειψη της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης οδηγεί σε διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση

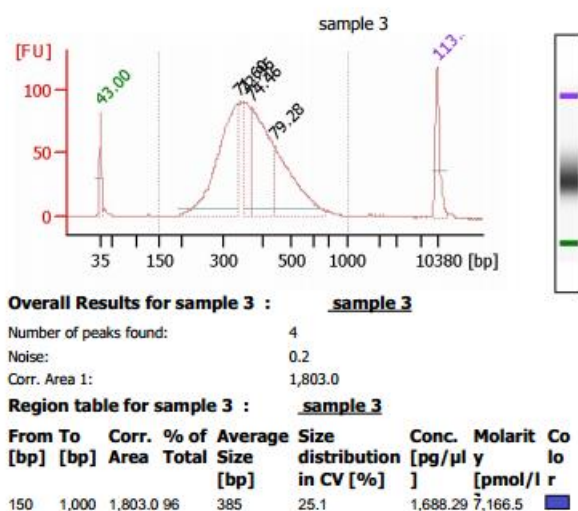
Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πριν και μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας

Έχοντας αποδείξει ότι η SUMΟυλίωση της CSB πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την επανάκαμψη της μεταγραφής μετά από UV ακτινοβολία, επόμενο βήμα αποτέλεσε η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της τροποποιημένης CSB πρωτεΐνης στο πρότυπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων πριν και μετά την επαγωγή DNA βλαβών. Προκειμένου να βρεθεί το σύνολο των γονιδίων, των οποίων η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται μετά από βλάβη (υπεριώδης ακτινοβολία), παρουσία ή μη λειτουργικών CSB πρωτεϊνών, απομονώθηκε το ολικό mRNA από τα φυσιολογικά κύτταρα HA-CSB, τα κύτταρα ασθενών CSB^{-/-} και τα κύτταρα CSB^{ΔSUMO} πριν από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και 30 λεπτά, 6, 19 και 48 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Μετά τη σύνθεση του cDNA οι διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών ελέγχθησαν αρχικά με qPCR (Εικόνα 31).



Εικόνα 20. Παράδειγμα μεταβολής έκφρασης τεσσάρων γονιδίων μετά από 19 ώρες από την ακτινοβολήση. Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση.

Έχοντας παρατηρήσει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης ορισμένων γονιδίων των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών, αποφασίσθηκε η κατασκευή βιβλιοθηκών, η αλληλούχιση τους και η ανάλυση και ποσοτικοποίηση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης (επίπεδα έκφρασης όλων των 3' mRNAs), χρησιμοποιώντας το σύστημα HiSeq της Illumina Serial Analysis of Gene Expression (SAGE™). Ποιοτικοί έλεγχοι των βιβλιοθηκών, λάμβαναν χώρα σε αρκετά στάδια κατά την κατασκευή τους. Το τελικό στάδιο ελέγχου, περιλαμβάνει τον έλεγχο του τελικού μεγέθους και της ποιότητας των βιβλιοθηκών με τη χρήση του λογισμικού Agilent Bioanalyzer. Παράδειγμα της πληροφορίας που λαμβάνεται από το Agilent Bioanalyzer, παρουσιάζεται στην Εικόνα 32. Σε περίπτωση που παρατηρηθεί ελλιπής καθαρισμός και ύπαρξη διμερών ανταπτόρων, τότε ο καθαρισμός/επιλογή του δείγματος επαναλαμβάνεται έως ότου ληφθεί δείγμα αρίστης ποιότητας για αλληλούχιση.



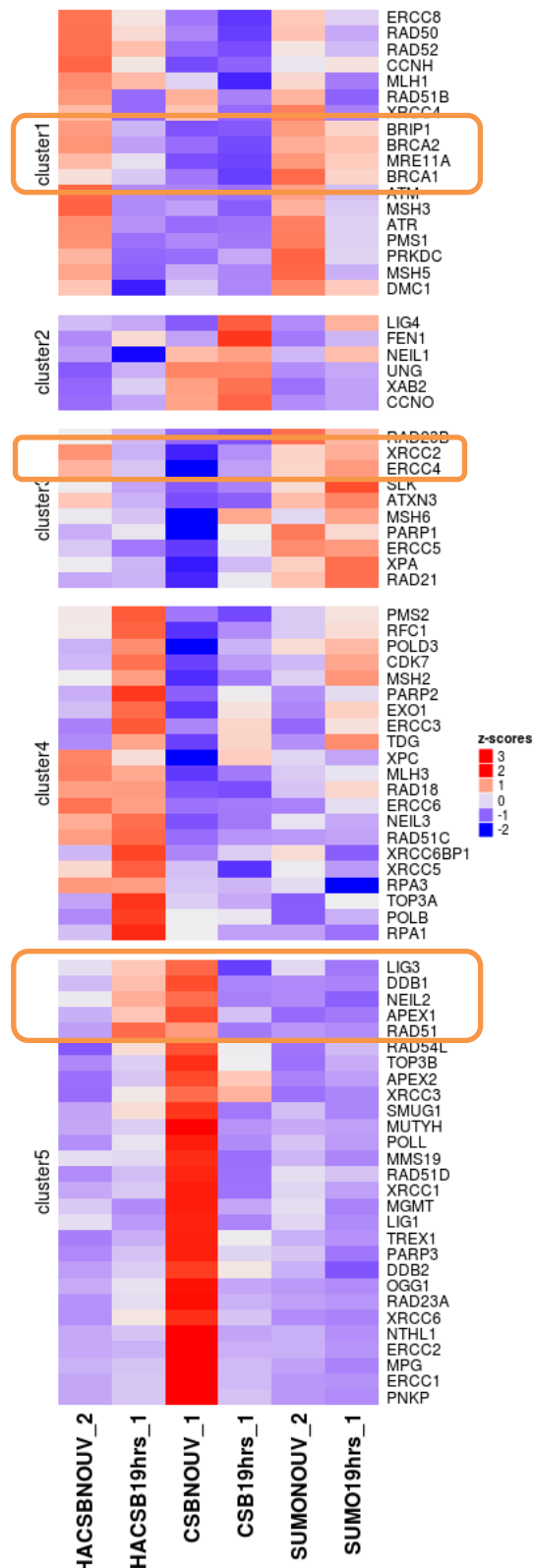
Εικόνα 32. Παράδειγμα ελέγχου ποιότητας της βιβλιοθήκης με χρήση του λογισμικού Agilent Bioanalyzer. Η βιβλιοθήκη, όπως φαίνεται έχει κατάλληλο προφίλ για αλληλούχιση με μέσο μοριακό βάρος τα 385 ζεύγη βάσεων.

Η αρχική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση, ανέδειξε ένα σημαντικό αριθμό γονιδίων με διαφορετική έκφραση μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων, των κυττάρων CS ασθενών και των μεταλλαγμένων κύτταρων CSB^{ASUMO}. Περαιτέρω ανάλυση, με ομαδοποίηση (clustering) των γονιδίων αυτών βάσει του

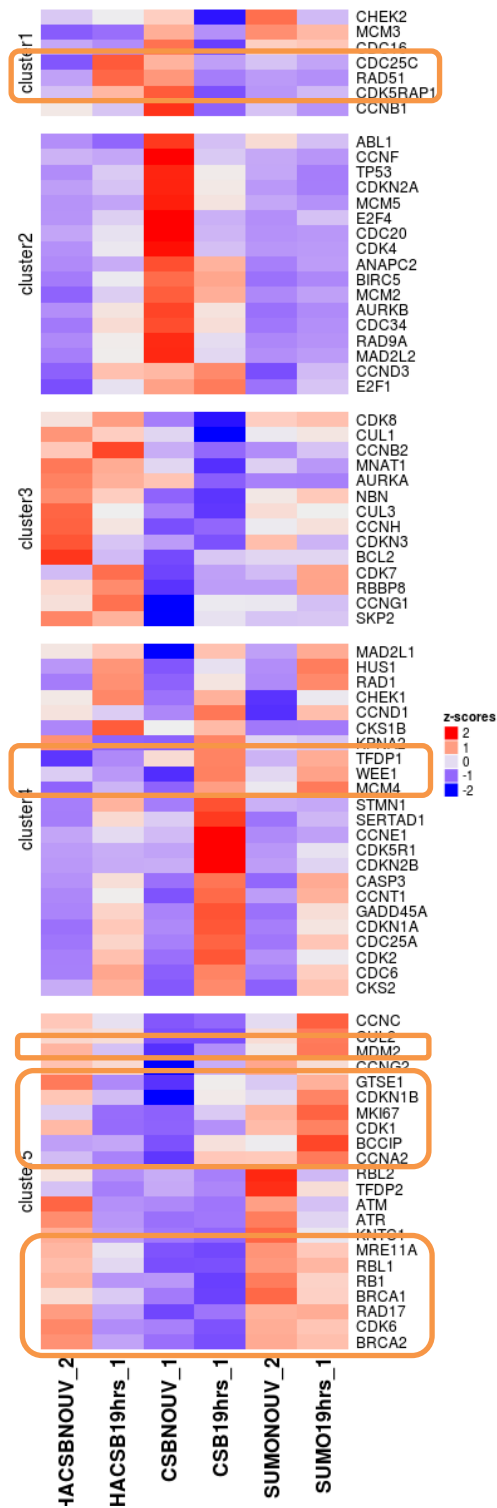
προτύπου γονιδιακής έκφρασης τους και κατηγοριοποίηση των ομάδων βάσει της λειτουργίας των γονιδίων, ανέδειξε 3 σημαντικές κατηγορίες με διαφορετικό πρότυπο μεταξύ των κυττάρων υπό μελέτη (Εικόνες 33-35). Η πρώτη κατηγορία που παρουσιάζεται στην Εικόνα 33, αφορά γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA. Εξ' αυτών ιδιαίτερη αναφορά, αξίζει να γίνει στα γονίδια όπου η έλλειψη της SUMΟύλιωσης έχει αντίκτυπο στα επίπεδα έκφρασης τους. Τέτοια παραδείγματα είναι τα γονίδια *BRIP1*, *BRCA2*, *MRE11A*, *BRCA1* από το Cluster 1 και τα *XRCC2* και *ERCC4* από το Cluster 3 τα οποία έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα HA-CSB, 19 ώρες μετά την ακτινοβολήση, ενώ έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO}. Αντίθετα, τα γονίδια *LIG3*, *DDB1*, *NEIL2*, *APEX1*, *RAD51* έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα HA-CSB, 19 ώρες μετά την ακτινοβολήση, ενώ έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO}.

Ακόμα πιο ενδιαφέρουσα είναι η ανάλυση heatmap διαφοροποιημένων προτύπων έκφρασης, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 34 και αφορά γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, τα γονίδια *CDC25C*, *RAD51*, *CDK5RAP1* από το Cluster 1 τα οποία έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα HA-CSB, 19 ώρες μετά την ακτινοβολήση, και χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO}. Αντίθετα γονίδια όπως το *TFDP1*, *WEE1*, *MCM4* από το Cluster 4 και τα *MDM2*, *GTSE1*, *CDKN1B*, *MKI67*, *CDK1*, *BCCIP*, *CCNA*, *MRE11A*, *RBL1*, *RB1*, *BRCA1*, *RAD17*, *CDK6*, *BRCA2* από το Cluster 5 έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα HA-CSB, 19 ώρες μετά την ακτινοβολήση, και υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO}. Συμπερασματικά, σε συνέπεια με τα προηγούμενα αποτελέσματα (βλ κεφάλαιο 3ο) όπου αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένων μορίων CDK1/Cdc2 βρέθηκαν στο ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων 16-30 ώρες μετά την ακτινοβολήση, παρατηρείται αυξημένη έκφραση των γονιδίων *CDK1* και *WEE1*, καθώς και μειωμένη έκφραση του γονιδίου *CDC25C*. (Υπενθυμίζουμε στον αναγνώστη ότι η φωσφορυλίωση της CDK1 ή αλλιώς Cdc2 από την πρωτεΐνη WEE1, οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου, ενώ αποφωσφορυλίωση της CDK1 ή Cdc2 οδηγεί σε συνέχιση του κυτταρικού κύκλου).

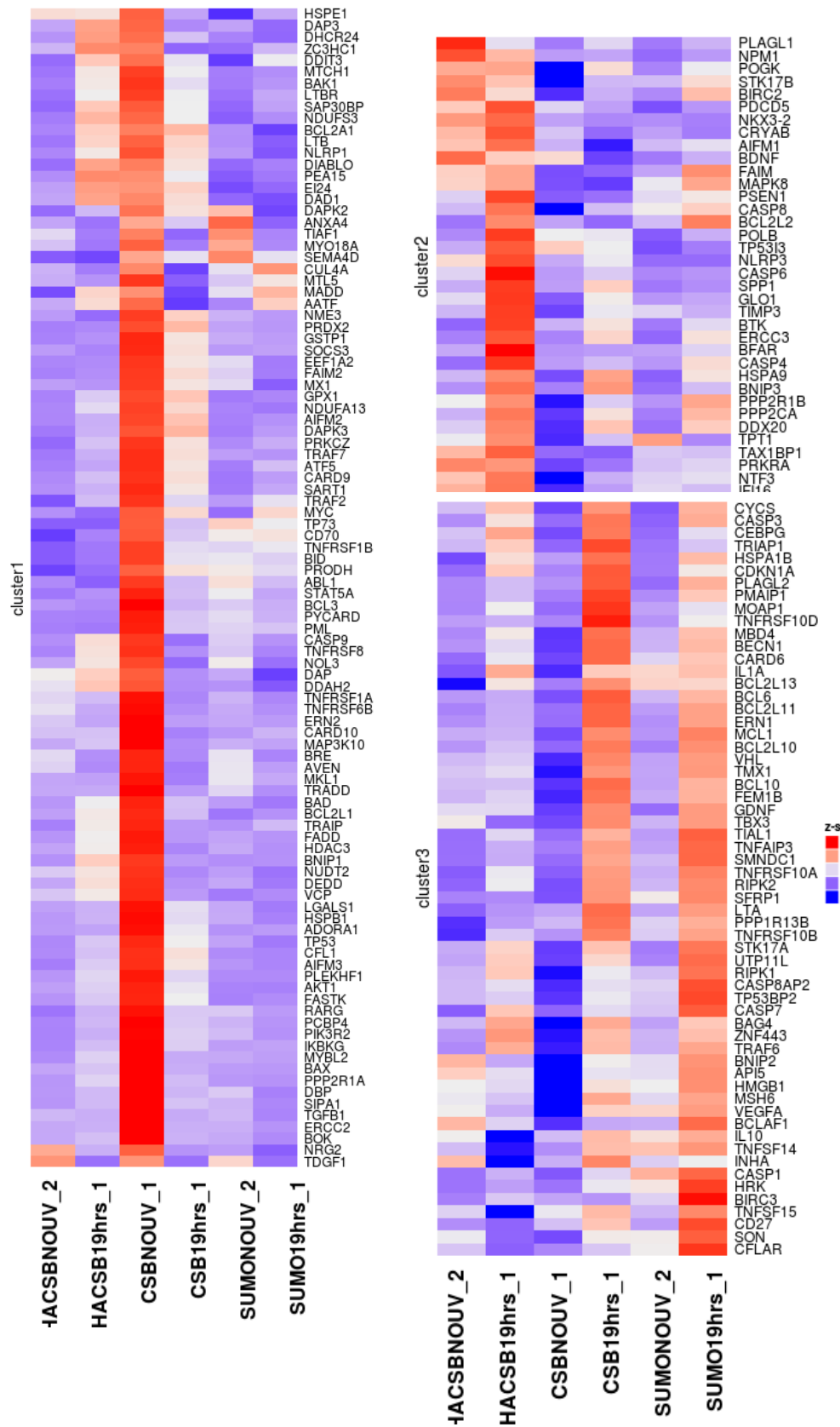
Τέλος, στην εικόνα 35 παρουσιάζεται η ανάλυση heatmap διαφοροποιημένων προτύπων έκφρασης, γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι της απόπτωσης. Όπως είναι εμφανές και αναμενόμενο λόγω της μη βιωσιμότητας των κυττάρων CSB^{ΔSUMO} μετά από ακτινοβολήση (κεφάλαιο 2), προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων με διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης μεταξύ των HA-CSB, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων.



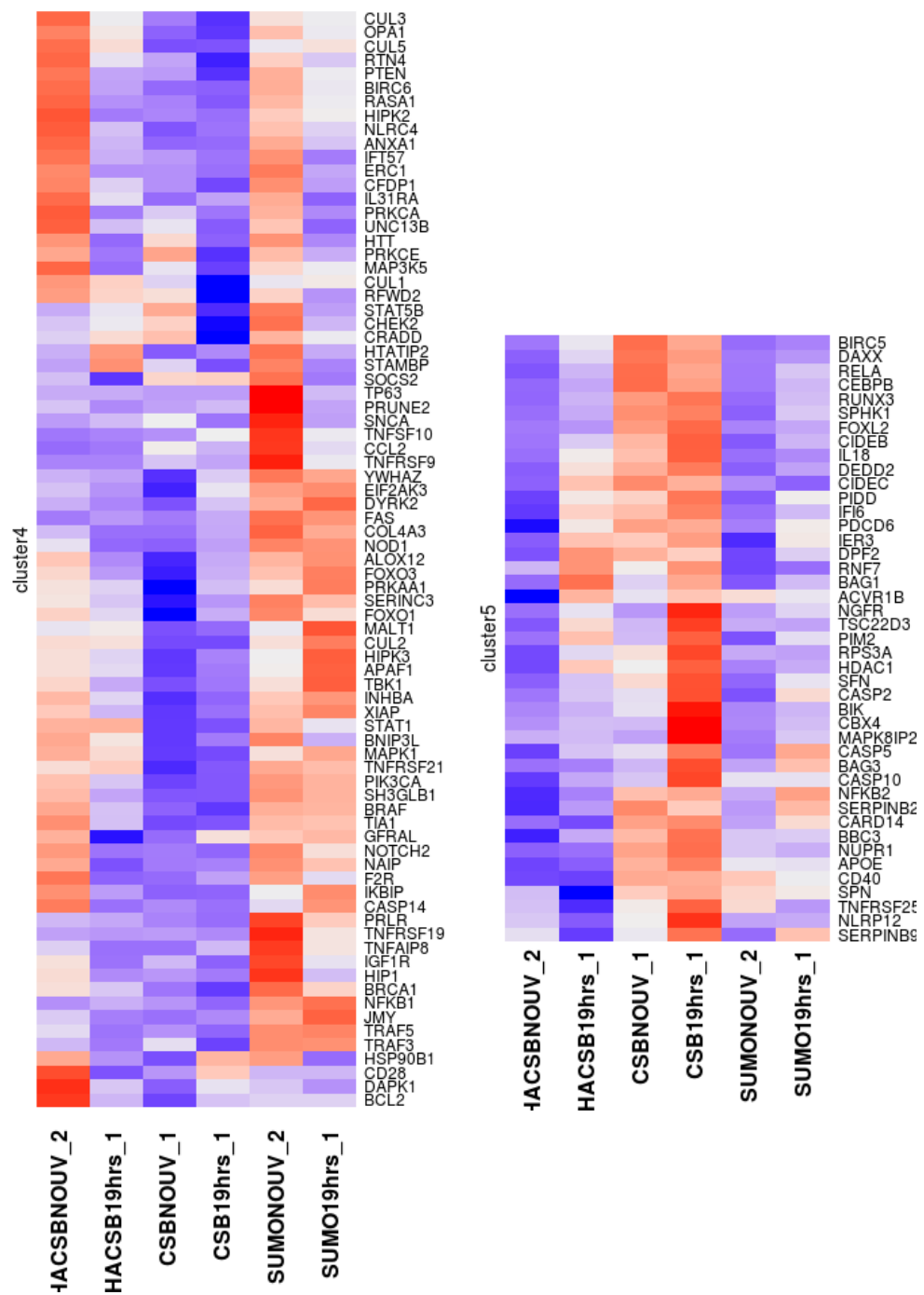
Εικόνα 33. Ανάλυση Heatmap που απεικονίζει τη διαφορετική έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση DNA μεταξύ των HA-CSB, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων πριν την ακτινοβόληση και 19 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Με κόκκινο παρουσιάζονται τα γονίδια που εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και με μπλε τα γονίδια με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης.



Εικόνα 34. Ανάλυση Heatmap που απεικονίζει τη διαφορετική έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μεταξύ των HA-CSB, CSB-/- και CSB^{ASUMO} κυττάρων πριν την ακτινοβόληση και 19 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Με κόκκινο παρουσιάζονται τα γονίδια που εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και με μπλε τα γονίδια με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης.



-----συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα-----



Εικόνα 35. Ανάλυση Heatmap που απεικονίζει τη διαφορετική έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι της απόπτωσης μεταξύ των HA-CSB, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων πριν την ακτινοβολήση και 19 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Με κόκκινο παρουσιάζονται τα γονίδια που εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και με μπλε τα γονίδια με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης.

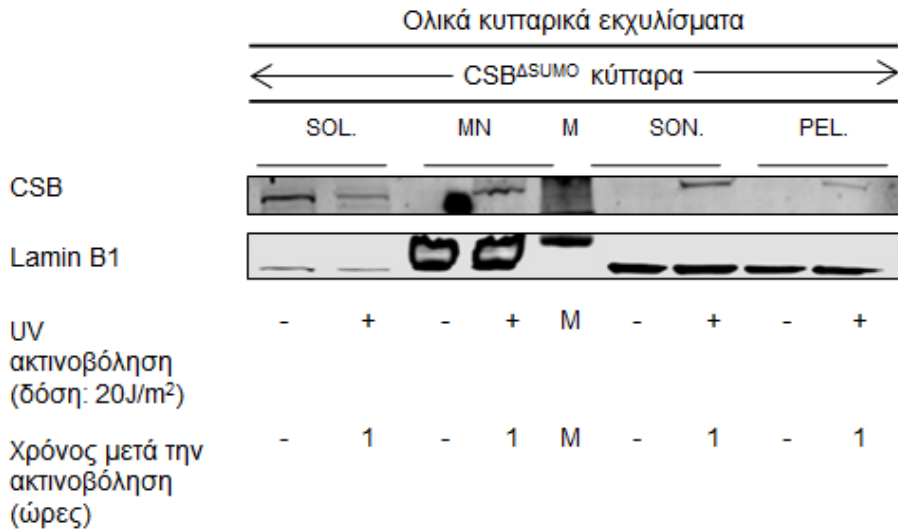
Κεφάλαιο 5^ο

Η SUMΟυλίωση της πρωτεΐνης CSB είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση της βλάβης και ως εκ τούτου παρατηρείται αυξημένη αλληλεπίδραση με την RNAPOLII στο σημείο της βλάβης 22 ώρες μετά την ακτινοβόληση.

Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της πρωτεΐνης CSB στη δέσμευση της στην χρωματίνη και στην αλληλεπίδραση της με την RNAPOLII σε σημεία βλαβών DNA.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CSB με την RNAPOLII επιμήκυνσης της μεταγραφής σταθεροποιείται μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία⁵. Επιπροσθέτως, εμπειριστατωμένη μελέτη των Lake και συνεργατών έδειξε ότι το αμινοτελικό άκρο της CSB –στο οποίο βρίσκονται και οι 3 μεταλλαγμένες Λυσίνες- είναι υπεύθυνο για την ειδικότητα της δέσμευσης του καρβοξυτελικού άκρου με την χρωματίνη και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της δέσμευσης αυτής υπό φυσιολογικές συνθήκες.⁶ Έτσι, επόμενο σημαντικό σημείο εστίασης της διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη του ενδεχόμενου ρόλου της SUMΟυλίωσης της πρωτεΐνης CSB στη δέσμευση της στην χρωματίνη και στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης και της RNAPOLII στο σημείο της βλάβης.

Τα αποτελέσματα της στρατολόγησης της CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης στην χρωματίνη μετά από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας παρουσιάζονται στην ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών της Εικόνας 36. Η πρωτεΐνη LaminB1 αποδεικνύει ότι τα δείγματα ακτινοβολημένων και μη κυττάρων έχουν ισο-φορτωθεί. Όπως είναι εύκολα διακριτό, η CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνη στρατολογείται στην χρωματίνη μία ώρα μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Ως εκ τούτου, η **SUMΟυλίωση της CSB πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη για την φυσιολογική δέσμευση της CSB στην χρωματίνη μετά από UV ακτινοβολία.**

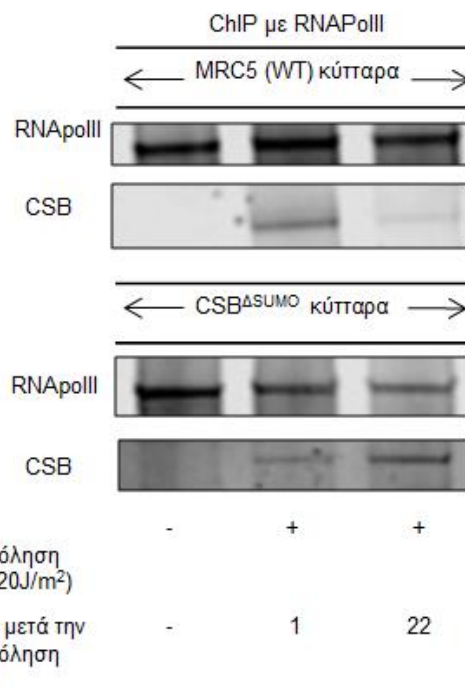
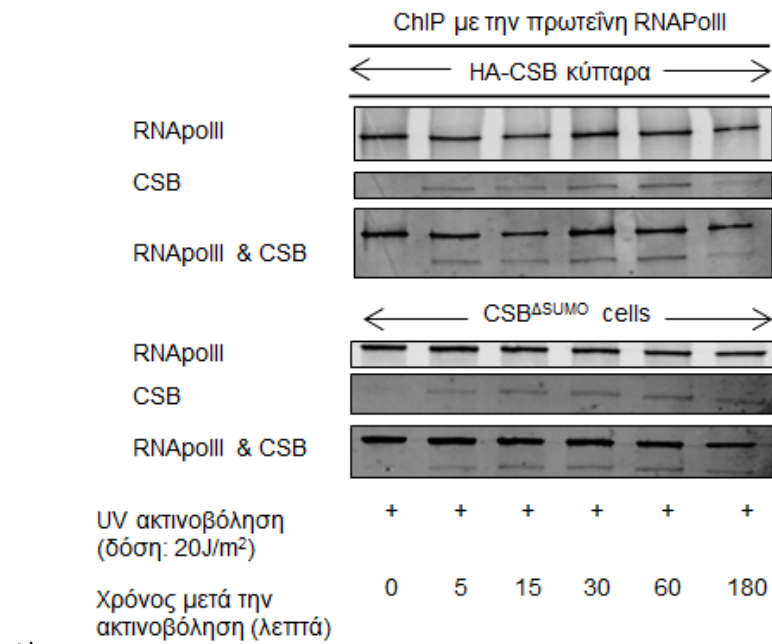


Εικόνα 36. Έλεγχος ενδεχόμενου ρόλου της SUMOύλιωσης της πρωτεΐνης CSB στη δέσμευση της στην χρωματίνη. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνικών ζωνών ακτινοβολημένων και μη κλασματοποιημένων κυττάρων. SOL: Κυτταροπλασματικές και πυρηνικές διαλυτές πρωτεΐνες (cytoplasmic and nuclear soluble), MN: Πρωτεΐνες δεσμευμένες στην χρωματίνη ύστερα από επώαση με μηάση, SON: Πρωτεΐνες δεσμευμένες στην χρωματίνη ύστερα από εφαρμογή υπερήχων (sonication), Pel: Εναπομένον ίζημα

Αντίστοιχα στην Εικόνα 37, παρουσιάζεται η μελέτη της δυναμικής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης και της RNAPOLII σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την UV ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα προκύπτουν ύστερα από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης έναντι της RNAPOLII επιμήκυνσης (φωσφορυλιωμένης στη θέση 2) και μετέπειτα ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών ζωνών έναντι της πρωτεΐνης CSB. Πιο αναλυτικά, στην εικόνα 37A διακρίνεται τόσο η CSB πρωτεΐνη των φυσιολογικών HA-CSB κυττάρων όσο και η μεταλλαγμένη CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνη να αλληλεπιδρά με την RNAPOLII άμεσα από τα πρώτα 5 λεπτά μετά την ακτινοβολία. Συμπερασματικά, η SUMOύλιωση της CSB πρωτεΐνης δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση της με την RNAPOLII, κατά τα πρώτα χρονικά διαστήματα, όπου γίνεται η επιδιόρθωση από το TC-NER μονοπάτι.

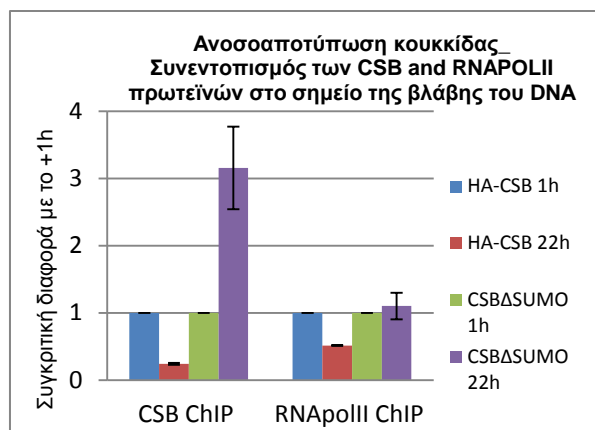
Επιπρόσθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της αλληλεπίδρασης της CSB πρωτεΐνης με την RNAPOLII 180 λεπτά μετά την ακτινοβολία, η οποία φαίνεται να μειώνεται στα HA-CSB κύτταρα, γεγονός που όπως είναι γνωστό βιβλιογραφικά συσχετίζεται με την επιδιόρθωση του μεγαλύτερου αριθμού βλαβών από το TC-NER υπομονοπάτι. Αντίθετα στα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα διατηρείται, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την απουσία επιδιόρθωσης της βλάβης. Επόμενο βήμα λοιπόν, αποτέλεσε η μελέτη των

αλληλεπιδράσεων της CSB πρωτεΐνης με την RNAPOLII σε ένα μεταγενέστερο χρονικό διάστημα (22 ώρες μετά την ακτινοβόληση), κατά το οποίο αναμένεται να έχει γίνει επιδιόρθωση της βλάβης. Στην Εικόνα 37B, παρουσιάζεται λοιπόν το πρότυπο αλληλεπίδρασης της CSB πρωτεΐνης με την RNAPOLII 22 ώρες μετά την ακτινοβόληση και παρατηρείται ότι σε αντίθεση με τα κύτταρα αγρίου τύπου όπου η αλληλεπίδραση της CSB πρωτεΐνης με την RNAPOLII μειώνεται ως αποτέλεσμα της επαναφοράς του κυττάρου σε εύρυθμη λειτουργία, η αλληλεπίδραση της CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης με την RNAPOLII αυξάνεται. Επόμενο λοιπόν βασικό ερώτημα ήταν κατά πόσον γίνεται επιδιόρθωση της βλάβης απουσία SUMOυλιωμένης CSB πρωτεΐνης. Για να μελετηθεί η τυχόν ύπαρξη μη επιδιορθωμένων DNA βλαβών στα τμήματα της χρωματίνης στα οποία είναι δεσμευμένη η RNAPOLII ή η CSB πρωτεΐνη των υπό σύγκριση κυττάρων, έγινε χρήση του πρωτοκόλλου ανοσοποτύπωσης κουκκίδας (Dot-Blot). Η τεχνική αυτή βασίζεται στη χρήση πρωτογενούς αντισώματος α-CPD το οποίο έχει την ικανότητα να ανιχνεύει τις βλάβες από CPDs (Υλικά και Μέθοδοι). Στην Εικόνα 38A, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των αποτελεσμάτων συνεντοπισμού της CSB και της RNAPOLII στο σημείο της βλάβης, ενώ στην εικόνα 38B παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων όλων των πειραμάτων που διενεργήθηκαν. Φαίνεται λοιπόν ότι κατά το διάστημα των 22 ωρών μετά την ακτινοβόληση, στα HA-CSB κύτταρα παρατηρείται μειωμένος συνεντοπισμός της CSB με την βλάβη, ενώ στα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα παρατηρείται αύξηση του συνεντοπισμού αυτού. Αντίστοιχα, παρατηρείται μείωση του συνεντοπισμού της RNAPOLII με την βλάβη στα HA-CSB κύτταρα και διατήρηση του επιπέδου συνεντοπισμού της RNAPOLII με την βλάβη στα CSB^{ΔSUMO} κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αφενός οι βλάβες στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO} δεν έχουν επιδιορθωθεί και αφετέρου και η RNAPOLII και η CSB βρίσκονται μπλοκαρισμένες στη χρωματίνη των ακτινοβολημένων κυττάρων στα σημεία με βλάβες. Ως εκ τούτου **η SUMOύλιωση του CSB είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση της βλάβης.**



Εικόνα 37. Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μεταλλαγμένης CSB^{ΔSUMO} πρωτεΐνης και της RNAPOLII στο σημείο της βλάβης. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνικών ζωνών ανοσοκατακρημνισμένων με RNAPOLII πρωτεϊνών ακτινοβολημένων φυσιολογικών HA-CSB και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων. Η αλληλεπίδραση της CSB με την RNAPOLII μελετήθηκε Α) σε σύντομα χρονικά διαστήματα μετά την ακτινοβόληση Β) 22 ώρες μετά την ακτινοβόληση (χρονικό διάστημα στο οποίο έχει επέλθει φυσιολογικά η επιδιόρθωση της βλάβης).

α-CPD Ανοσοαποτύπωση κουκκίδας (Dot Blot)		
	CSBΔSUMO κύτταρα	HA-CSB κύτταρα
CSB ChIP No UV		
CSB ChIP 1H		
CSB ChIP 22H		
RNApolII ChIP No UV		
RNApolII ChIP 1H		
RNApolII ChIP 22H		



Εικόνα 38. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κουκκίδας (Dot-Blot) με χρήση του πρωτογενούς αντισώματος α-CPD, ανοσοκατακρημνισμένων με RNAPOLII ή CSB δειγμάτων φυσιολογικών και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων. Α) Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των αποτελεσμάτων συνεντοπισμού της CSB και της RNAPOLII στο σημείο της βλάβης, Β) Μέσος όρος μετρήσεων τουλάχιστον 2 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Κεφάλαιο 6^ο

Η έλλειψη της SUMΟυλίωσης της πρωτεΐνης CSB οδηγεί, 22 ώρες μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, σε εμφάνιση:

-διαφορετικού προφίλ δέσμευσης της RNAPOLII επιμήκυνσης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα και έλλειψη ανάκαμψης του σήματος της RNAPOLII στα επίπεδα πριν την ακτινοβολία.

-μεγαλύτερης πιθανότητας εντοπισμού της RNAPOLII πλησιέστερα του υποκινητή,

-συσσώρευσης νεοσυντιθέμενου RNA στην αρχή του γονιδίου καθώς και

-εμπλουτισμού των κυττάρων σε πρόδρομα mRNA πλησίον την θέσης έναρξης της μεταγραφής

Ο ρόλος της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην επιμήκυνση της μεταγραφής μετά από UV ακτινοβολία.

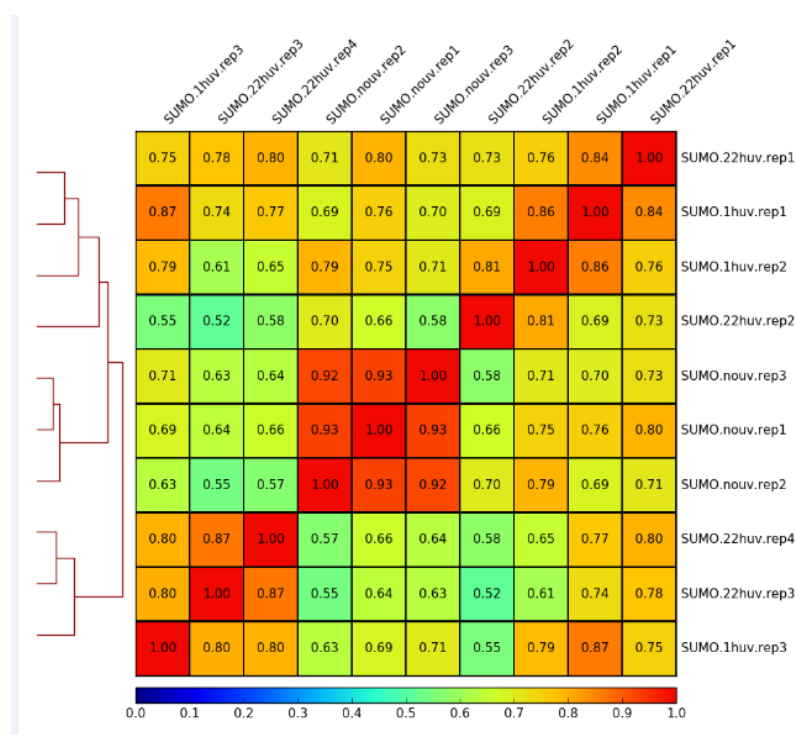
Προσφάτως, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, δημοσιεύτηκε από μέλη του εργαστηρίου Φουστέρη, ότι ανθρώπινα κύτταρα αποκρινόμενα στο γενετοξικό στρες, μεταπίπτουν σε μία κατάσταση η οποία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «λειτουργία ασφαλείας της μεταγραφής ή safe mode», με αυξημένη απελευθέρωση της RNAPOLII-ser2P στη φάση παραγωγικής επιμήκυνσης.¹⁴⁴ Αυτός ο μηχανισμός άμυνας των κυττάρων προάγει μία καθολική, γρήγορη και συγχρονισμένη εκ νέου απελευθέρωση μορίων RNAPOLII από τις θέσεις παύσης πλησίον των υποκινητών (Proximal Promoter Pausing site- PPP) στο εσωτερικό όλων των ενεργών γονιδίων.¹⁴⁴ Έτσι, δεδομένου του γεγονότος ότι η RNAPOLII είναι η πρωτεΐνη-κλειδί για τον έλεγχο του γονιδιώματος και την ανίχνευση βλαβών για την ενεργοποίηση του TC-NER μονοπατιού, ο αυξημένος αριθμός RNAPOLII που εκτελούν μεταγραφική επιμήκυνση συμβάλλει στη γρήγορη και ομοιόμορφη ανίχνευση και κατά συνέπεια επιδιόρθωση των βλαβών.

Όπως επίσης αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, η CSB πρωτεΐνη αποτελεί μετά την RNAPOLII βασικό ρυθμιστικό παράγοντα στην ενεργοποίηση του TC-NER μονοπατιού. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στη διερεύνηση του ενδεχόμενου ρόλου της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην απελευθέρωση των μορίων της RNAPOLII από θέσεις PPP ως απόκριση

στην UV ακτινοβολία. Καθώς τα πειράματα που περιγράφηκαν στην άνωθεν μελέτη πραγματοποιήθηκαν σε συγχρονισμένους hTERT ινοβλάστες του δέρματος, πρώτος στόχος αποτέλεσε η διερεύνηση της συμπεριφοράς της RNAPOLII επιμήκυνσης μετά από UV ακτινοβολία στον υπό σύγκριση μη συγχρονισμένο SV40 κυτταρικό πληθυσμό ινοβλαστών HA-CSB. Για την επίτευξη αυτού, έγινε μελέτη των σημείων πρόσδεσης της RNAPOLII στο DNA μέσω αλληλούχισης σε γενωμικό επίπεδο του -ανοσοκατακρημνισμένου με την RNAPOLII- DNA. Μεγάλη προσπάθεια έγινε επίσης για την πραγματοποίηση πειραμάτων ανοσοκατακρήμισης με την πρωτεΐνη CSB και μετέπειτα αλληλούχισης του -ανοσοκατακρημνισμένου με CSB- DNA προκειμένου να προσδιοριστούν τα σημεία πρόσδεσης των CSB πρωτεϊνών (CSB αγρίου τύπου και CSB^{ΔSUMO}). Το πρότυπο των σημείων πρόσδεσης της RNAPOLII στο DNA ελέγχθη για τα δύο χρονικά διαστήματα. Το πρώτο χρονικό διάστημα αποτέλεσε η 1 ώρα μετά την ακτινοβολία, χρονικό διάστημα ανάκαμψης των κυττάρων κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η επιδιόρθωση του DNA. Ενώ, το δεύτερο χρονικό διάστημα, ήταν οι 22 ώρες μετά την ακτινοβολία, διάστημα κατά το οποίο σε φυσιολογικά κύτταρα θα αναμένονταν να έχει γίνει η επιδιόρθωση του DNA και αναμένεται το πρότυπο πρόσδεσης της RNAPOLII στο DNA να προσομοιάζει το πρότυπο πρόσδεσης της RNAPOLII στο DNA μη ακτινοβολημένων κυττάρων.

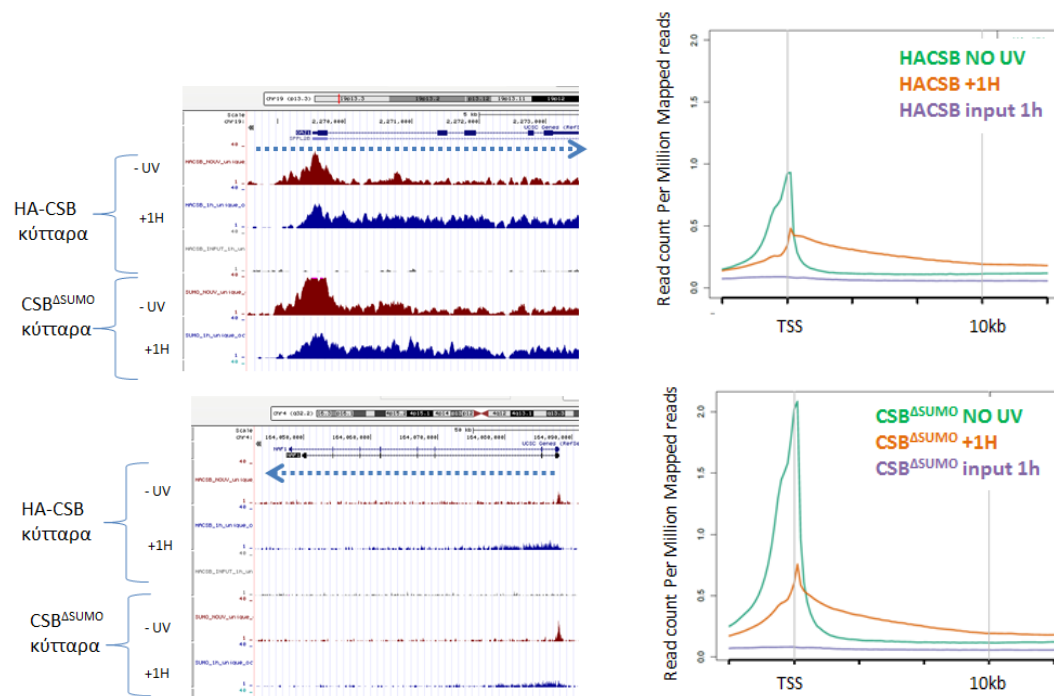
Το πρωτόκολλο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη των παραπάνω περιελάμβανε την αξιολόγηση της ειδικότητας του DNA, που προέκυψε μετά την ανοσοκατακρήμιση με τα αντισώματα RNAPOLII και CSB, μέσω ποσοτικοποιημένης PCR ανάλυσης (βλ Υλικά και Μέθοδοι Παραγρ. II 3Aι) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης για έλεγχο DNA με qPCR). Στην συνέχεια, ακολούθησε η προετοιμασία των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και η αποστολή τους για αλληλούχιση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ποιότητα της αλληλούχισης των δειγμάτων ελέγχεται και μετά την αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του DNA μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με την RNAPOLII επανελήφθησαν τρεις φορές με επιτυχία. Αντιθέτως, μόνο μία σειρά δειγμάτων πέρασε τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης του DNA μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με την πρωτεΐνη CSB. Για την συγχώνευση των αποτελεσμάτων, έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων και της συσχέτισής τους με διαφορετικά λογισμικά πακέτα (όπως το Pearson) για να επιλεχθούν τα πιο όμοια δείγματα. Στην Εικόνα 39, παρατίθεται η ανάλυση συσχέτισης Pearson για τα δείγματα ανοσοκατακρημνισμένα με RNAPOLII των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων. Τα δείγματα για να θεωρηθούν όμοια και να συνενωθούν πρέπει να έχουν πάνω από 0,75 μονάδες συσχέτισης, και να μην παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με δείγματα διαφορετικής συνθήκης. Τα

δεδομένα αξιολογήθηκαν σε συνεργασία με τους τους υπεύθυνους Βιοπληροφορικής ανάλυσης του εργαστηρίου Φουστέρη (Δημήτρη Κωνσταντόπουλο και Dr Matthieu Lavigne), του Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλ. Φλέμιγγκ».



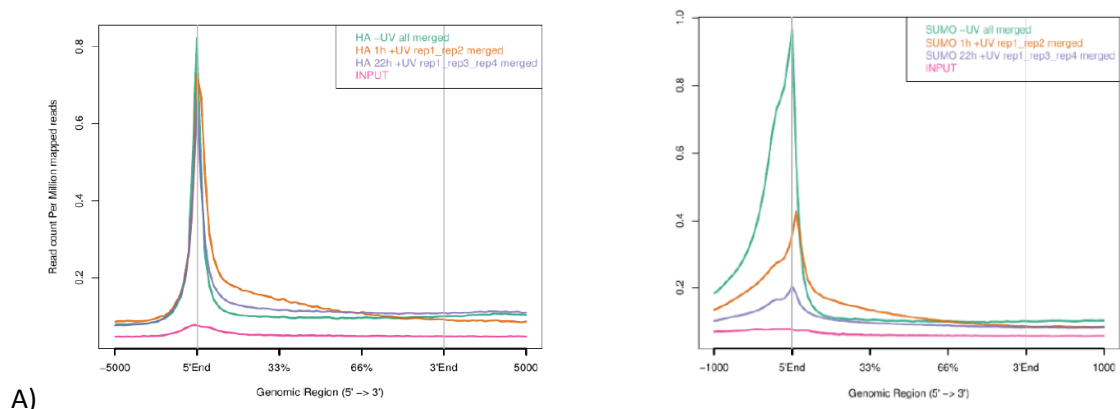
Εικόνα 39. Ανάλυση συσχέτισης Pearson για τα ανοσοκατακρημνισμένα με RNAPOLII δείγματα των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων

Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν μετά την συνένωση τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, επιβεβαίωσαν τα πειράματα των Lavigne et al., αναδεικνύοντας πλέον και σε μη συγχρονισμένη κυτταρική σειρά την πρόκληση αντίστοιχης απελευθέρωσης της RNAPOLII επιμήκυνσης από το PPP ως αποτέλεσμα απόκρισης σε γενotoξικό στρες (Εικόνα 40). Στην εικόνα 40A, παρατίθενται χαρακτηριστικά παραδείγματα δύο γονιδίων όπως παρουσιάζονται στον Genome Browser, ενώ στην 40B παρατίθεται το γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος για όλα τα ενεργά γονίδια (gene coverage plot), από θέση έναρξης μεταγραφής (TSS) έως και 10.000 βάσεις μετά το TSS. Είναι λοιπόν εμφανές, αντίστοιχο «κύμα» απελευθέρωσης της RNAPOLII επιμήκυνσης, τόσο στα φυσιολογικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO}.



Εικόνα 40. Αποτελέσματα πειραμάτων ChIP sequencing έναντι της RNAPOLII πριν και μετά την ακτινοβόληση HA-CSB και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων. Α. Παραδείγματα δύο γονιδίων όπως παρουσιάζονται στον Genome Browser, Β. Γράφημα αποτύπωσης της μέσης πυκνότητας του σήματος για όλα τα ενεργά γονίδια (gene coverage plot), από τη θέση έναρξης μεταγραφής (TSS) έως και 10.000 βάσεις μετά το TSS. 9

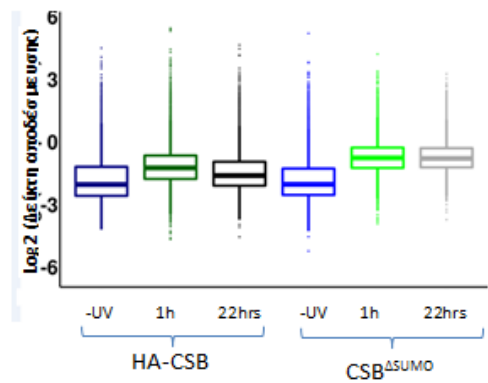
Από την άλλη πλευρά, ενώ παρατηρήθηκε παρόμοιο προφίλ δέσμευσης της RNA πολυμέρασης μεταξύ των HA-CSB και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων μία ώρα μετά την ακτινοβόληση, παρατηρείται διαφορετικό προφίλ 22 ώρες μετά (Εικόνα 41A). Πιο αναλυτικά, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα παρατηρήθηκε τάση ανάκαμψης του προτύπου δέσμευσης της RNAPOLII κατά το χρονικό διάστημα των 22 ωρών μετά την ακτινοβόληση στα επίπεδα πριν την ακτινοβόληση, παρατηρείται απουσία αντίστοιχης ανάκαμψης των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων. Για περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων, συγκρίθηκε ο αριθμός των μορίων RNAPOLII που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από τον υποκινητή (+100 ζεύγη βάσεων έως +2000 ζεύγη βάσεων από το σημείο έναρξης της μεταγραφής) με τον αριθμό των μορίων που βρίσκονται πλησίον του υποκινητή (-250 ζεύγη βάσεων έως +100 ζεύγη βάσεων από το σημείο έναρξης της μεταγραφής) και υπολογίστηκε έτσι ο «δείκτης αποδέσμευσης» των μορίων πολυμεράσης (αριθμός μορίων σε μεγαλύτερη απόσταση υποκινητή/ αριθμός μορίων πλησίον του υποκινητή). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 41B, έδειξαν ότι, παρόλο που και στις δύο κυτταρικές σειρές ο αριθμός των μορίων της RNA πολυμεράσης που αποδεσμεύονται



A)

Δείκτης αποδέσμευσης =

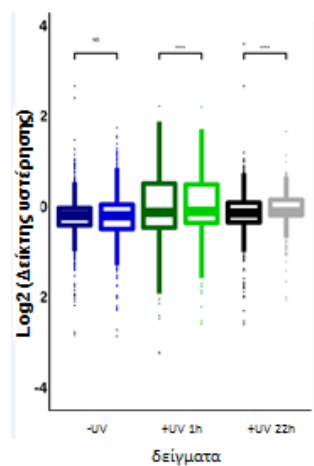
$$\frac{+100 \text{ ζ.β. έως } +2000 \text{ ζ.β.}}{-250 \text{ ζ.β. έως } +100 \text{ ζ.β.}}$$



B)

Δείκτης υστέρησης =

$$\frac{+2500 \text{ ζ.β. έως } 20000 \text{ ζ.β.}}{20000 \text{ ζ.β. έως και } 40000 \text{ ζ.β.}}$$



Γ)

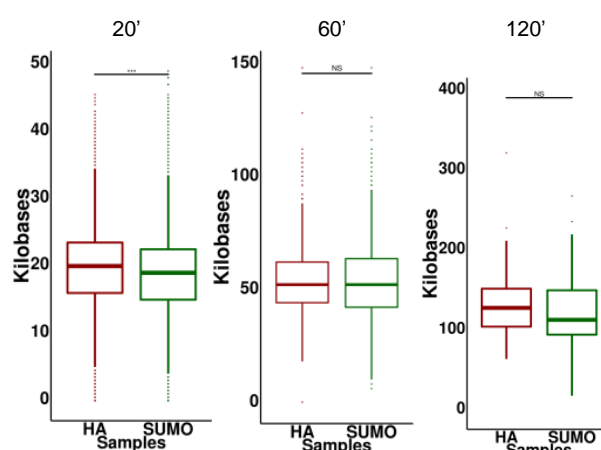
Εικόνα 41. Αποτελέσματα σύγκρισης των CHIP-seq δεδομένων που προέκυψαν μετά από ανοσοκατακρημνιση με RNAPOLII δειγμάτων ακτινοβολημένων (1 ώρα και 22 ώρες μετά την ακτινοβολία) και μη κυττάρων. Α) Προφίλ σημείων δέσμευσης της RNAPOLII των HA-CSB (αριστερά) και των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων (δεξιά). **Β)** Απεικόνιση του δείκτη αποδέσμευσης ως αυτός ορίζεται στο κείμενο. **Γ)** Απεικόνιση του δείκτη υστέρησης ως αυτός ορίζεται στο κείμενο. Όπου δεν αναγράφεται, αριστερά στην σύγκριση τοποθετείται η σειρά HA-CSB και δεξιά η CSB^{ΔSUMO}. Όπου «ζ.β.» =ζεύγη βάσεων.

από το PPP αυξάνεται, μόνο η φυσιολογική κυτταρική σειρά επιδεικνύει στις 22 ώρες μετά την ακτινοβόληση, τάση ανάκαμψης προς τα επίπεδα πριν την ακτινοβόληση. Αντίθετα, η κυτταρική σειρά CSB^{ΔSUMO} δείχνει παρόμοια αποτελέσματα μεταξύ της 1 ώρας και των 22 ωρών, αναδεικνύοντας έτσι έναν πιθανό **ρόλο της SUMOύλιωσης του CSB στην ανάκαμψη του σήματος της RNAPOLII στα επίπεδα πριν την ακτινοβόληση.**

Στη συνέχεια, επιπρόσθετη ανάλυση των αποτελεσμάτων συγκρίνοντας των αριθμό των μορίων RNAPOLII που βρίσκονται πλησιέστερα του υποκινητή (+2500 ζεύγη βάσεων έως +20000 ζεύγη βάσεων από το σημείο έναρξης μεταγραφής) με τον αριθμό των μορίων που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από τον υποκινητή (+20000 ζεύγη βάσεων έως +40000 ζεύγη βάσεων από το σημείο έναρξη μεταγραφής) επέτρεψαν τον υπολογισμό του «δείκτη υστέρησης» των μορίων πολυμεράσης (πλησίον/ μεγαλύτερη απόσταση) (Εικόνα 41Γ). Κατά την σύγκριση των δεικτών υστέρησης των δύο κυτταρικών σειρών έγινε εμφανές ότι, ενώ σε συνθήκες χωρίς ακτινοβόληση οι δύο σειρές φέρουν τον ίδιο δείκτη υστέρησης, κατόπιν της ακτινοβόλησης η κυτταρική σειρά CSB^{ΔSUMO}, έχει μεγαλύτερο δείκτη υστέρησης και άρα **υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα εντοπισμού της RNAPOLII των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων στο σημείο πλησιέστερα του υποκινητή απ' ότι εκτενέστερα του υποκινητή, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα.**

Ο ρόλος της SUMOύλιωσης της CSB πρωτεΐνης στην δυναμική της μεταγραφής μελετήθηκε με μία ακόμα μέθοδο η οποία εστιάζεται στη χρονική μελέτη του νεοσυντιθέμενου RNA (nascent RNA sequencing) που προκύπτει μετά από επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας. Το πρωτόκολλο της μεθόδου αναλύεται διεξοδικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, υποενότητα II6). Περιληπτικά, έγινε επώαση των κυττάρων προς σύγκριση με τον αναστολέα της μεταγραφής DRB για 90 λεπτά (στιγμή 0), χρόνος που κρίθηκε αρκετός για την ολοκλήρωση της μεταγραφής των ήδη δεσμευμένων σε γονίδια RNA πολυμερασών. Στη συνέχεια έγινε ακτινοβόληση των κυττάρων και επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό απουσία DRB. Στη χρονική αυτή στιγμή αναμένεται επανεκκίνηση της μεταγραφής λόγω «απελευθέρωσης» των πολυμερασών που βρίσκονται εγκλωβισμένες στο σημείο παύσης της επιμήκυνσης **πλησιέστερα του υποκινητή PPP** και νέα σύνθεση RNA μορίων. Η απομόνωση των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων έγινε μετά από συλλογή του συνολικού RNA σε διάφορες χρονικές στιγμές για 0, 20, 60 λεπτά, 2 και 22 ώρες μετά από την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας. Ως δείγμα ελέγχου της διαδικασίας, το οποίο δεν είχε ακτινοβοληθεί, συλλέχθηκε 75 λεπτά μετά την αφαίρεση του DRB.

Τα αποτελέσματα της μελέτης «επανεκκίνησης της μεταγραφής» παρουσίασαν παραπλήσια κινητική μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, εμφανίζοντας διαφορές στην ικανότητα σύνθεσης νέου RNA μόνο κατά το πρώτο εικοσάλεπτο (Εικόνα 42). Ο σχεδιασμός και η δοκιμή ενός πρωτοκόλλου το οποίο δίνει αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα όσον αφορά τη δημιουργία του νεοσυντιθέμενου RNA, μας έδωσε τη δυνατότητα για περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της SUMΟυλίωσης του CSB και της επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη των σημείων πρόσδεσης της RNAPOLII επιμήκυνσης και της συσχέτισης τους με την μελέτη του νεοσυντιθέμενου RNA.



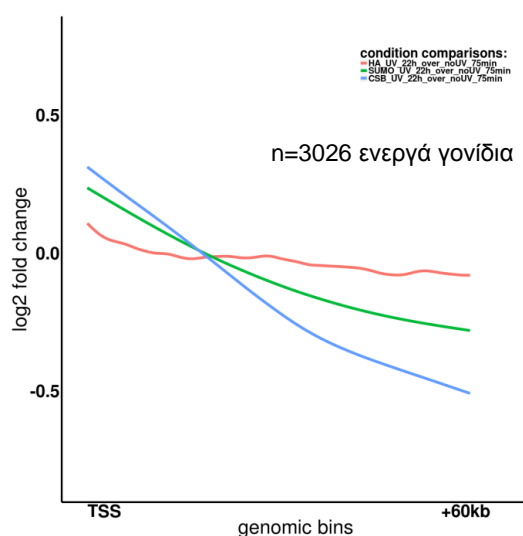
Εικόνα 42. Σύγκριση του «μετώπου» του νεοσυντιθέμενου RNA των HA-CSB και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων μετά από 20, 60 και 120 λεπτά.

Έτσι, το νεοσυντιθέμενο RNA των HA-CSB, CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO} κυττάρων ελέγχθηκε στην συνέχεια κατά το χρονικό διάστημα 22 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Στα φυσιολογικά κύτταρα, κατά το διάστημα των 22 ωρών μετά την ακτινοβολήση αναμένεται να έχει γίνει επαναφορά των επιπέδων σύνθεσης RNA σε επίπεδο παρόμοιο των μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Επίσης, στα φυσιολογικά κύτταρα αναμένεται να υπάρχει ίση κατανομή των επιπέδων των νεοσυντιθέμενων RNA κατά μήκος των γονιδίων (από την αρχή ως το τέλος του γονιδίων). Σε αντίθεση, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του νεοσυντιθέμενου RNA 22 ώρες μετά την ακτινοβολήση στα κύτταρα CSB^{-/-} και CSB^{ΔSUMO}.

Στην Εικόνα 43, συγκρίνεται το νεοσυντιθέμενο RNA 3026 ενεργών γονιδίων στις 3 κυτταρικές σειρές 22 ώρες μετά την ακτινοβολήση με το αντίστοιχο RNA των μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Όπως είναι εύκολα διακριτό, η κατανομή του σήματος του νεοσυντιθέμενου RNA των HA-CSB κυττάρων (κόκκινη γραμμή) μεταξύ των ακτινοβολημένων (22 ώρες μετά) και μη κυττάρων είναι η ίδια από το σημείο έναρξης της

μεταγραφής (TSS) και έως και 60 kb μετά το TSS. Αντιθέτως, τα ακτινοβολημένα $CSB^{-/-}$ κύτταρα (μπλε γραμμή), παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά νεοσυντιθέμενου RNA στην αρχή των γονιδίων (σε μικρή απόσταση από το TSS) και μειωμένα ποσοστά σε μεγαλύτερη απόσταση από το TSS. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι νέα μόρια nRNA συνεχίζουν να παράγονται στα ενεργά γονίδια, ακόμα και 22 ώρες μετά την UV ακτινοβολία. Ωστόσο, η μεταγραφή των μορίων αυτών δεν ολοκληρώνεται λόγω της παρατεταμένης παρεμπόδισης της πορείας των πολυμερασών επιμήκυνσης και συσσώρευσης τους μαζί με μόρια CSB στις βλάβες (βλ κεφάλαιο 5 Αποτελεσμάτων). Τα αποτελέσματα αυτά είναι πλέον σημαντικά καθώς η χρήση παλαιότερων μεθόδων ποσοτικοποίησης του νεοσυντιθέμενου RNA, όπως ο ανοσοφθορισμός (IF), δεν ήταν αρκετά ευαίσθητες για να επιτρέπουν τον εντοπισμό μικρών τμημάτων μορίων RNA.

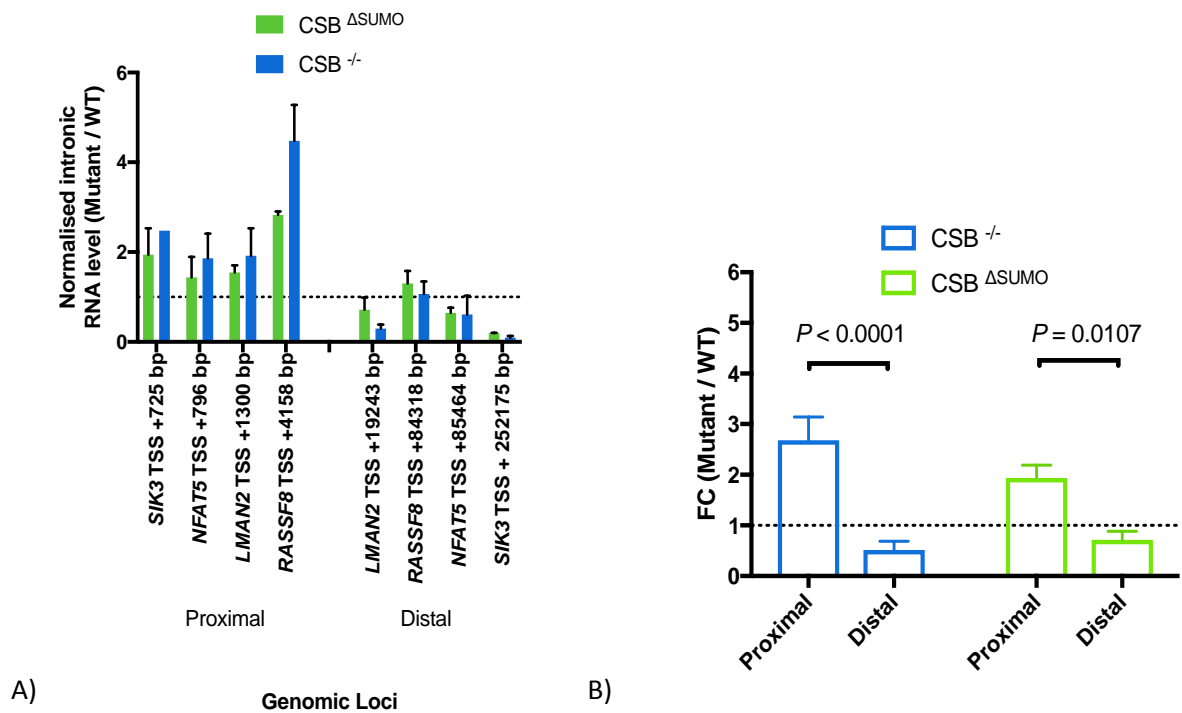
Σε αντιστοιχία με τα $CSB^{-/-}$ κύτταρα, τα $CSB^{\Delta SUMO}$ κύτταρα (πράσινη γραμμή), παρουσιάζουν αύξηση της κατανομής του σήματος, του νεοσυντιθέμενου RNA των ακτινοβολημένων κυτταρών σε σύγκριση με των μη ακτινοβολημένων κυττάρων, σε κοντινή απόσταση από το TSS και μείωση σε μεγαλύτερη απόσταση από το TSS. Το γεγονός ότι τα $CSB^{\Delta SUMO}$ κύτταρα εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ με τα $CSB^{-/-}$ κύτταρα, σημαίνει ότι η **SUMOύλιωση της πρωτεΐνης CSB παίζει σημαντικό ρόλο για την ολοκλήρωση της μεταγραφής μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, καθώς η έλλειψη αυτής οδηγεί σε συσσώρευση του νεοσυντιθέμενου RNA στην αρχή του γονιδίου.**



Εικόνα 43 Μελέτη της κατανομής του νεοσυντιθέμενου RNA (ακτινοβολημένων/μη ακτινοβολημένων) HA-CSB (κόκκινη γραμμή), $CSB^{-/-}$ (μπλε γραμμή) και $CSB^{\Delta SUMO}$ (πράσινη γραμμή) κυττάρων.

Παράλληλα με τη μελέτη του νεοσυντιθέμενου RNA, διερευνήθηκε και η πορεία του RNA που δεν έχει υποστεί ωρίμανση. Για την μελέτη του πρόδρομου λοιπόν RNA, ακτινοβολημένα ή μη κύτταρα των τριών κυτταρικών σειρών, συλλέχθηκαν 22 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Ο αναστολέας DRB προστέθηκε 3 ώρες πριν την συλλογή στα μισά δείγματα και στόχος της προσθήκης αυτής αποτέλεσε ο εκμηδενισμός του αριθμού των νεοσυντιθέμενων μορίων RNA που προκύπτουν λόγω νέας εκκίνησης της μεταγραφής. Το συνολικό RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την δημιουργία cDNA, αντικατόπτριζε τόσο τα πρόδρομα μόρια RNA όσο το ώριμο mRNA καθώς έγινε χρήση του εκκινητή τυχαίας ακολουθίας 6 βάσεων για δημιουργία μονόκλωνου cDNA. Το cDNA το οποίο παρήχθει ελέγχθηκε με qPCR και συγκεκριμένα συγκρίθηκε ο εμπλουτισμός (enrichment) των εκκινητών που βρίσκεται πλησίον του TSS σε σχέση με μεγαλύτερη απόσταση από το TSS. Οι εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη, βρίσκονται σε ιντρόνια οπότε και επιτρέπουν την μελέτη μόνο του πρόδρομου RNA και όχι του ώριμου mRNA που δεν περιέχει ιντρόνια.

Τα αποτελέσματα του πειράματος που παρουσιάζονται στην Εικόνα 44, δείχνουν τα επίπεδα εμπλουτισμού των πρόδρομων RNA των ακτινοβολημένων έναντι των μη ακτινοβολημένων $CSB^{-/-}$ και CSB^{ASUMO} κυττάρων. Τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα των φυσιολογικών κυττάρων. Αποδεικνύεται, λοιπόν, η ύπαρξη εμπλουτισμού των πρόδρομων RNA τόσο των ακτινοβολημένων $CSB^{-/-}$ όσο και των CSB^{ASUMO} κυττάρων στις περιοχές των γονιδίων που ελέγχθηκαν και βρίσκονται πλησίον του TSS. Από την άλλη πλευρά παρατηρείται αντίστροφη σχέση στις περιοχές που ελέγχθηκαν και βρίσκονται σε πιο μακρινή απόσταση από το TSS. Συμπερασματικά, **η SUMΟυλίωση της πρωτεΐνης CSB είναι σημαντική για την ωρίμανση του mRNA και έλλειψη αυτής οδηγεί σε εμπλουτισμό των κυττάρων σε πρόδρομα mRNA πλησίον του TSS.**



Εικόνα 44. Μελέτη του πρόδρομου μη επεξεργασμένου RNA A) μέσω σύγκρισης του εμπλουτισμού 8 ιντρονικών γενετικών τόπων (κανονικοποίηση γίνεται μέσω σύγκρισης με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα) B) μέσω μελέτης των γενετικών τόπων πλησιέστερα του υποκινητή (proximal) και σε μεγαλύτερη απόσταση από αυτόν (distal).

Συμπεράσματα

Στην βιβλιογραφία εντοπίζεται πληθώρα μελετών, οι οποίες έχουν ως στόχο την διερεύνηση των πολλαπλών ρόλων της CSB πρωτεΐνης, ως η πλέον σημαντική πρωτεΐνη για την εύρυθμη λειτουργία του μηχανισμού TC—NER και η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την εμφάνιση του 80% του πληθυσμού ατόμων με σύνδρομο Cockayne. Έλαχιστες όμως μελέτες επικεντρώνονται στη ρύθμιση των πολλαπλών αυτών λειτουργιών της CSB. Η παρούσα διδακτορική διατριβή, αναγνωρίζοντας την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός πολύπλοκου και αξιόπιστου μηχανισμού ρύθμισης της CSB, ο οποίος θα λειτουργεί τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά πρωτίστως σε καταστάσεις γενετοξικού στρες, στόχευσε στη μελέτη της ρύθμισης της CSB πρωτεΐνης.

Αρχικά ευρήματα της διατριβής επιβεβαίωσαν ότι μεγάλο ποσοστό της CSB πρωτεΐνης, που δεσμεύεται στη χρωματίνη, τροποποιείται σύντομα μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία, από την SUMO 2/3 πρωτεΐνη. Έτσι, κύριος στόχος αποτέλεσε η μελέτη της σημασίας της τροποποίησης αυτής για την εύρυθμη λειτουργία της CSB πρωτεΐνης μετά από UV ακτινοβολία. Για να επιτευχθεί το παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε το τριπλό μετάλλαγμα CSB^{ΔSUMO} και μελετήθηκαν τα δύο κύρια χαρακτηριστικά των CS κυττάρων. Βρέθηκε ότι τόσο η βιωσιμότητα των κυττάρων και η δυνατότητα δημιουργίας αποικιών, όσο και η επανάκαμψη του ολικού νεοσυντιθέμενου RNA επηρεάστηκαν σημαντικά με την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Έγινε λοιπόν αμέσως εμφανές ότι η SUMOύλιωση της CSB πρωτεΐνης είναι πλέον σημαντική για τα κύτταρα καθώς έλλειψη αυτής προκαλεί ευαισθησία των κυττάρων στην UV ακτινοβολία.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έως τότε δεν είχε αναφερθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία τροποποίηση της CSB πρωτεΐνης από την SUMO πρωτεΐνη. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, μελέτη η οποία παρουσίαζε τη SUMOύλιωση της CSB πρωτεΐνης δημοσιεύτηκε το 2016.¹⁵⁷ Στη μελέτη εκείνη, εντοπίστηκαν δύο πιθανές θέσεις SUMOύλιωσης της CSB στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (K1487, K1489) και μία πιθανή θέση SUMOύλιωσης στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (K205). Όταν οι ερευνητές δημιούργησαν και έλεγξαν το διπλό μετάλλαγμα CSB_{K1487R, K1489R} (2K→R) καθώς και το τριπλό μετάλλαγμα CSB_{K1457R, K1487R, K1489R} (3K→R) για αποφυγή SUMOύλιωσης της πλησιέστερης λυσίνης παρατήρησαν μη απεμπολισμό της SUMOύλιωσης της CSB. Αντίστοιχα, μετά τη μετάλλαξη της λυσίνης 205 (η οποία αποτελεί και μέρος του τριπλού μεταλλάγματος της παρούσας διατριβής), παρατηρήθηκε μερικώς απεμπολισμός της SUMOύλιωσης της CSB. Έτσι, παρόλο που η μεταλλαγή αυτή προσέδωσε μερική ευαισθησία στην UV ακτινοβολία, η μελέτη ολοκληρώθηκε και δεν έγινε περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της SUMOύλιωσης της CSB. Έτσι, η παρούσα διατριβή συνεχίζει να είναι η πρώτη μελέτη που παρουσιάζει τις ακριβείς

θέσεις της SUMΟυλίωσης της CSB πρωτεΐνης, η μετάλλαξη των οποίων απεμπολεί ολοκληρωτικά την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της CSB και ως εκ τούτου δύναται να απαντήσει σε βασικά ερωτήματα που θέτονται ως προς τον ρόλο αυτής στην λειτουργία της CSB μετά από έκθεση σε γενετοξικό παράγοντα.

Η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων ως απόκριση σε κυτταροτοξικούς παράγοντες όπως η UV ακτινοβολία, περιλαμβάνει τη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης CSB με την RNAPOLII επιμήκυνσης της μεταγραφής. Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής αποδεικνύουν ότι η SUMΟυλίωση της CSB πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη ούτε για τη δέσμευση της στην χρωματίνη αλλά ούτε και για την αλληλεπίδραση της με την RNAPOLII στο σημείο της βλάβης κατά τα πρώτα χρονικά διαστήματα μετά την UV ακτινοβολία. Αντίστοιχα, κατά το πρώτο χρονικό διάστημα (μία ώρα μετά την ακτινοβολία), παρατηρείται ότι η αναδιοργάνωση της μεταγραφής που συντελείται στα κύτταρα μετά την επίδραση γενετοξικών παραγόντων και περιλαμβάνει την απελευθέρωση «κύματος» RNA πολυμερασών επιμήκυνσης από την περιοχή πλησίον του υποκινητή (PPP) σε όλα ανεξαιρέτως τα ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια, λαμβάνει χώρα με παρόμοια δυναμική και απουσία SUMΟυλιωμένης CSB πρωτεΐνης. Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης «επανεκκίνησης της μεταγραφής» στα πρώτα στάδια μετά την ακτινοβολία ήταν αντίστοιχα μεταξύ των φυσιολογικών και των CSB^{ΔSUMO} κυττάρων, αποδεικνύοντας ότι η SUMΟυλίωση της CSB πρωτεΐνης δεν παίζει ρόλο στην ταχύτητα σύνθεσης νέου RNA μεταγράφων μετά την αφαίρεση του αναστολέα της μεταγραφής.

Παρατηρείται λοιπόν ότι ενώ SUMΟυλίωση της CSB πρωτεΐνης δε φαίνεται να είναι απαραίτητη μέχρι και 1 ώρα μετά την ακτινοβολία, η βλάβη δεν επιδιορθώνεται και μάλιστα η αλληλεπίδραση της CSB πρωτεΐνης με την RNAPOLII στο σημείο της βλάβης 22 ώρες μετά την ακτινοβολία αυξάνεται. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η SUMΟυλίωση της CSB πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση του μηχανισμού επιδιόρθωσης της βλάβης.

Ως αποτέλεσμα της διαρκούς παρουσίας βλάβης, τα κύτταρα αποκρίνονται με συνεχή απελευθέρωση RNA πολυμερασών από το PPP. Η απελευθέρωση αυτή 22 ώρες μετά την ακτινοβολία αποδείχθηκε με ανάλυση του βαθμού αποδέσμευσης των RNA πολυμερασών από τον υποκινητή, ο οποίος εμφανίστηκε αυξημένος και σε αντίστοιχο επίπεδο με τον ίδιο δείκτη μία ώρα μετά την ακτινοβολία. Έχοντας αποδείξει λοιπόν την ύπαρξη αντίστοιχης απελευθέρωσης «κύματος» RNA πολυμεράσων από το PPP, και ταυτοχρόνως την έλλειψη επιδιόρθωσης της βλάβης στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO} είναι αναμενόμενο ότι σύντομα μετά την πρώτη RNAPOLII που θα «σταματήσει» στο σημείο της

βλάβης, θα προστεθούν σε αυτή και ένα πλήθος RNA πολυμερασών. Η συσσώρευση αυτών των RNA πολυμερασών, αναμένεται να διαφοροποιήσει το πρότυπο δέσμευσης της RNAPOLII κατά μήκος του γονιδίου. Πράγματι, ύστερα από ανάλυση του δείκτη υστέρησης, γίνεται εμφανές ότι η έλλειψη της SUMOυλίωσης της CSB πρωτεΐνης οδηγεί σε αυξημένο σήμα δέσμευσης/εντοπισμού των RNA πολυμερασών στην αρχή σε σύγκριση με πιο απομακρυσμένες από τους υποκινητές περιοχές των γονιδίων. Μάλιστα, επιπρόσθετα της μεταγραφής που δεν ολοκληρώνεται, η αυξημένη ευαισθησία των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής αυτής διατριβής, οδήγησε στην ανάλυση και του νεοσυντιθέμενου, μη ολοκληρωμένου μετάγραφου. Η μελέτη λοιπόν αυτή απέδειξε ότι η αυξημένη δέσμευση της RNAPOLII στην αρχή του γονιδίου συνοδεύεται με αντίστοιχη συσσώρευση νεοσυντιθέμενου RNA. Επόμενο ερώτημα που απαντήθηκε στην παρούσα διατριβή, αφορούσε την πορεία του RNA που έχει συντεθεί τουλάχιστον 3 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων και το οποίο δεν έχει υποστεί ωρίμανση. Με χρήση λοιπόν ειδικού ερευνητικού πρωτοκόλλου που περιελάμβανε την προσθήκη του αναστολέα επιμήκυνσης DRB σε προχωρημένο στάδιο ανάκαμψης των κυττάρων για την αναστολή κάθε νέας σύνθεσης RNA, έγινε αντιληπτό ότι τα μόρια αυτά παραμένουν ως έχει και εντοπίζονται συσσωρευμένα στην αρχή των γονιδίων.

Συνολικά, λοιπόν, παρατηρούμε, 22 ώρες μετά την ακτινοβόληση, σε μικρή απόσταση από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, να συσσωρεύονται στο σημείο της βλάβης: η πρωτεΐνη CSB, ένας σημαντικός αριθμός RNA πολυμερασών, ένας αντίστοιχος αριθμός νεοσυντιθέμενων RNA καθώς και πρόδρομων RNA η μεταγραφή των οποίων δεν ολοκληρώνεται. Η παρατεταμένη συσσώρευση όλων των παραπάνω μορίων, είναι ικανή να δημιουργήσει «σύγκρουση» της λειτουργίας της μεταγραφής με αυτή της αντιγραφής (replication fork and transcription collision) με καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο και τον οργανισμό. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι τα αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή, για το ρόλο της SUMOυλίωσης της CSB πρωτεΐνης στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση του μηχανισμού απόκρισης των κυττάρων με ελαττωματικό μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών ύστερα από έκθεση σε UV ακτινοβολία.

Πιο αναλυτικά, η μελέτη αυτή ανέδειξε ως αποτέλεσμα της έλλειψης της SUMOυλίωσης της CSB πρωτεΐνης, την ανικανότητα των κυττάρων να ολοκληρώσουν την S φάση του κυτταρικού κύκλου και να ξεκινήσουν τη μίτωση. Αποδεικνύεται λοιπόν από τον περαιτέρω διαχωρισμό της S φάσης σε πρώιμη, ενδιάμεση και όψιμη, καθώς και από την μελέτη των κυτταρικών υπολειμμάτων στο δείγμα, ότι με την είσοδο των κυττάρων στην

πρώιμη S φάση, αυξάνεται ο αριθμός των νεκρών κυττάρων και τα κύτταρα δεν προχωρούν στην ολοκλήρωση της. Η μελέτη των Mc Kay et al., επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής ως προς τη σημασία που έχει η είσοδος του κυττάρου στην φάση αντιγραφής του DNA, για την πρόκληση κυτταρικής απόπτωσης¹⁵⁸. Πιο αναλυτικά, οι ερευνητές αποδεικνύουν ότι η κυτταρική απόπτωση προκαλούμενη από έκθεση σε UV ακτινοβολία, είναι αποτέλεσμα της εισόδου των κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν ελαττωματικό μηχανισμό TC-NER, στη φάση της αντιγραφής του DNA, καθώς αποφυγή της εισόδου αυτής μέσω θεραπείας με μιμοσίνη (mimosine, ουσία που διατηρεί τα κύτταρα στην G1 φάση) μειώνει σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα κυτταρικής απόπτωσης. Οι ερευνητές τέλος καταλήγουν στο ερώτημα το οποίο αξίζει να διερευνηθεί, για το αν τα κύτταρα πεθαίνουν κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της S φάσης. Ερώτημα το οποίο απαντά η συγκεκριμένη διατριβή, καθώς τα κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρική απόπτωση πριν ακόμα ολοκληρώσουν την S φάση.

Το αποτέλεσμα αυτό, είναι σε συμφωνία με την υπόθεσή ότι τα κύτταρα ξεκινούν την αντιγραφή του DNA τους (παρόλο που η επιδιόρθωση της βλάβης δεν έχει ολοκληρωθεί) και καθώς το σύμπλοκο της αντιγραφής φθάνει στο σημείο της βλάβης, βρίσκεται αντιμέτωπο με την προαναφερθείσα εικόνα συσσωρευμένων μορίων, η οποία δεν δύναται να ξεπεραστεί. Ως εκ τούτου το κύτταρο οδηγείται σε μία κατάσταση όπου είναι προτιμότερη η επιλογή της απόπτωσης, γεγονός που αποδεικνύεται τόσο από τη μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων όσο και από τα αποτελέσματα αλληλούχισης του συνολικού mRNA όπου εμφανίζεται διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων και ενεργοποίηση μονοπατιών που σχετίζονται τόσο με την επιδιόρθωση του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όσο και με την απόπτωση.

Στα πλαίσια της μελέτης αυτής θέλαμε να διαλευκάνουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς με τους οποίους σηματοδοτείται η παύση του κυτταρικού κύκλου και το κύτταρο οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό, έλαβε χώρα η διερεύνηση της δυναμικής των πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν ο εντοπισμός της συσσωρευμένης φωσφορυλιωμένης ανενεργής CDC2 κινάσης 16-30 ώρες μετά την ακτινοβόληση, η οποία είναι υπεύθυνη για την παύση του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο πριν τη μίτωση. Με μεγάλο επίσης ενδιαφέρον, εντοπίστηκε στα κύτταρα CSB^{ASUMO} 19 ώρες μετά την ακτινοβόληση, αυξημένη έκφραση του γονιδίου *CDC2* καθώς και του γονιδίου *WEE1*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί την ανενεργή μορφή της CDC2 κινάσης. Με αντίστοιχο ενδιαφέρον, εντοπίστηκε στην λίστα γονιδίων με διαφοροποιημένη έκφραση το γονίδιο *CDC25C*. Σε

συμφωνία με τα αποτελέσματα μας από την παραπάνω ανάλυση το γονίδιο αυτό, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που αποφωσφορυλιώνει και καθιστά ενεργή τη CDC2, εμφάνισε μειωμένη έκφραση στα κύτταρα CSB^{ΔSUMO}.

Ολοκληρώνοντας αυτή τη διατριβή, αξίζει να αναφερθεί ότι η συμπτωματολογία του νευροεκφυλισμού έχει συνδεθεί με την παρουσία των R-loops, δηλαδή υβριδίων RNA-DNA, που προκύπτουν μετά τη σύγκρουση της μεταγραφής και της αντιγραφής¹⁵⁹. Έτσι, η διατριβή αυτή, που στόχο είχε τη διερεύνηση του μηχανισμού απόκρισης των κυττάρων ύστερα από έκθεση σε γενετοξικό παράγοντα, ελλείψεως της σημαντικής τροποποίησης της CSB πρωτεΐνης από την SUMO πρωτεΐνη, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εφαλτήριο για την καλύτερη κατανόηση του συνδρόμου Cockayne και των μηχανισμών που οδηγούν σε απόπτωση των κυττάρων και σε νευροεκφυλιστική συμπτωματολογία.

Μάλιστα, στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα διδακτορική έρευνα δεν προσφέρει μόνο περαιτέρω κατανόηση του ρόλου της CSB πρωτεΐνης για την επιδιόρθωση του DNA και την ανάκαμψη της μεταγραφής μετά από την έκθεση σε γενετοξικό παράγοντα, αλλά δεδομένου του γεγονότος ότι η ανάκαμψη της μεταγραφής αποτελεί δείκτη ορόσημο των κυττάρων ασθενών με CS ανεξάρτητα από τη συμπτωματολογία τους, αναγνωρίζοντας το μονοπάτι δράσης της SUMOυλιωμένης CSB πρωτεΐνης, η έρευνα αυτή δύναται να οδηγήσει στην ανεύρεση νέων μονοπατιών στόχων για την θεραπεία ασθενών με CS.

Βιβλιογραφία

- 1 Boer, J. & Hoeijmakers, J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, **21** (23): 453-460 (2000).
- 2 Lindahl, T. & Wood, R. D. Quality control by DNA repair. *Science* **286**, 1897-1905, (1999).
- 3 Friedberg, E. C., Walker, G. C. & Siede, W. DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press Washington DC* (1995).
- 4 de Cock, J. G. *et al.* Repair of UV-induced (6-4)photoproducts measured in individual genes in the Drosophila embryonic Kc cell line. *Nucleic Acids Res* **20**, 4789-4793 (1992).
- 5 Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374, (2001).
- 6 Hanawalt, P. C. & Spivak, G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 958-970, (2008).
- 7 Tornaletti, S. & Hanawalt, P. C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* **81**, 139-146, (1999).
- 8 Scrima, A. *et al.* Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* **135**, 1213-1223, (2008).
- 9 Gillet, L. C. J. & Scharer, O. D. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical Reviews* **106**, 253-276, (2006).
- 10 Friedberg, E. C. Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem* **65**, 15-42, (1996).
- 11 Vermeulen, W and Fousteri, M. Mammalian Transcription-Coupled Repair. *Cold Spring Harb Perspect in Biology* **5**:a012625 (2013).
- 12 Koehler, D. R. & Hanawalt, P. C. Recruitment of damaged DNA to the nuclear matrix in hamster cells following ultraviolet irradiation. *Nucleic Acids Res* **24**, 2877-2884, (1996).
- 13 Nakatsu, Y. *et al.* XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* **275**, 34931-34937, (2000).
- 14 Reines, D., Chamberlin, M. J. & Kane, C. M. Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene in vitro. *J Biol Chem* **264**, 10799-10809 (1989).
- 15 Lim, J. H. *et al.* Chromosomal protein HMGN1 enhances the acetylation of lysine 14 in histone H3. *EMBO J* **24**, 3038-3048, (2005).
- 16 Sugasawa, K., Akagi, J., Nishi, R., Iwai, S. & Hanaoka, F. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. *Mol Cell* **36**, 642-653, (2009).
- 17 Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M. & Wood, R. D. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* **16**, 6559-6573, (1997).
- 18 Aboussekhra, A. *et al.* Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-868, (1995).
- 19 Ogi, T. *et al.* Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell* **37**, 714-727, (2010).

- 20 Matsunaga, T., Mu, D., Park, C. H., Reardon, J. T. & Sancar, A. Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *J Biol Chem* **270**, 20862-20869 (1995).
- 21 Mortusewicz, O., Rothbauer, U., Cardoso, M. C. & Leonhardt, H. Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites. *Nucleic Acids Res* **34**, 3523-3532, (2006).
- 22 Staresinic, L. *et al.* Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J* **28**, 1111-1120,(2009).
- 23 Rapin, I. Disorders of nucleotide excision repair. *Handb Clin Neurol* **113**, 1637-1650, (2013).
- 24 Kraemer, K. H. *et al.* Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* **145**, 1388-1396, (2007).
- 25 Kraemer, K. H., Lee, M. M., Andrews, A. D. & Lambert, W. C. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol* **130**, 1018-1021 (1994).
- 26 Ljungman, M. & Zhang, F. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene* **13**, 823-831 (1996).
- 27 Reid-Bayliss, K. S., Arron, S. T., Loeb, L. A., Bezrookove, V. & Cleaver, J. E. Why Cockayne syndrome patients do not get cancer despite their DNA repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10151-10156, (2016).
- 28 Kleijer, W. J. *et al.* Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* **7**, 744-750, (2008).
- 29 Khayat, M., Hardouf, H., Zlotogora, J. & Shalev, S. A. High carriers frequency of an apparently ancient founder mutation p.Tyr322X in the ERCC8 gene responsible for Cockayne syndrome among Christian Arabs in Northern Israel. *Am J Med Genet A* **152A**, 3091-3094, (2010).
- 30 Falik-Zaccai, T. C. *et al.* Cockayne syndrome type II in a Druze isolate in Northern Israel in association with an insertion mutation in ERCC6. *Am J Med Genet A* **146A**, 1423-1429, (2008).
- 31 Nance, M. A. & Berry, S. A. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* **42**, 68-84, (1992).
- 32 Wilson, B. T. *et al.* The Cockayne Syndrome Natural History (CoSyNH) study: clinical findings in 102 individuals and recommendations for care. *Genet Med* **18**, 483-493, (2016).
- 33 Laugel, V. Cockayne Syndrome. doi:NBK1342 [bookaccession] (1993).
- 34 Boltshauser, E. *et al.* MRI in Cockayne syndrome type I. *Neuroradiology* **31**, 276-277 (1989).
- 35 Sugita, K., Takanashi, J., Ishii, M. & Niimi, H. Comparison of MRI white matter changes with neuropsychologic impairment in Cockayne syndrome. *Pediatr Neurol* **8**, 295-298 (1992).
- 36 Niedernhofer, L. J., Bohr, V. A., Sander, M. & Kraemer, K. H. Xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients. *Mech Ageing Dev* **132**, 340-347, (2011).

- 37 Neilan, E. G. *et al.* Response of motor complications in Cockayne syndrome to carbidopa-levodopa. *Arch Neurol* **65**, 1117-1121, (2008).
- 38 Mayne, L. V. & Lehmann, A. R. Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Res* **42**, 1473-1478 (1982).
- 39 Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. & Mayne, L. V. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4707-4711 (1990).
- 40 van Hoffen, A. *et al.* Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res* **21**, 5890-5895 (1993).
- 41 Stefanini, M., Fawcett, H., Botta, E., Nardo, T. & Lehmann, A. R. Genetic analysis of twenty-two patients with Cockayne syndrome. *Hum Genet* **97**, 418-423 (1996).
- 42 Schwertman, P. *et al.* UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat Genet* **44**(45):598-602. (2012).
- 43 Itoh, T., Ono, T. & Yamaizumi, M. A new UV-sensitive syndrome not belonging to any complementation groups of xeroderma pigmentosum or Cockayne syndrome: siblings showing biochemical characteristics of Cockayne syndrome without typical clinical manifestations. *Mutat Res* **314**, 233-248, (1994).
- 44 Spivak, G. & Hanawalt, P. C. Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* **5**, 13-22, (2006).
- 45 Jaspers, N. G. *et al.* First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am J Hum Genet* **80**, 457-466, (2007).
- 46 Graham, J. M., Jr. *et al.* Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a nucleotide excision-repair defect and a mutated XPD gene, with prenatal diagnosis in a triplet pregnancy. *Am J Hum Genet* **69**, 291-300, (2001).
- 47 Nospikel, T., Lalle, P., Leadon, S. A., Cooper, P. K. & Clarkson, S. G. A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3116-3121 (1997).
- 48 Meira, L. B. *et al.* Manitoba aboriginal kindred with original cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome has a mutation in the Cockayne syndrome group B (CSB) gene. *Am J Hum Genet* **66**, 1221-1228, (2000).
- 49 Laugel, V. *et al.* Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome: three additional cases with CSB mutations, new diagnostic criteria and an approach to investigation. *J Med Genet* **45**, 564-571, (2008).
- 50 Zhou, H. X. & Wang, G. Predicted structures of two proteins involved in human diseases. *Cell Biochem Biophys* **35**, 35-47, (2001).
- 51 Henning, K. A. *et al.* The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell* **82**, 555-564, (1995).
- 52 Groisman, R. *et al.* The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* **113**, 357-367, (2003).

- 53 Troelstra, C. *et al.* ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* **71**, 939-953,(1992).
- 54 Flaus, A., Martin, D. M., Barton, G. J. & Owen-Hughes, T. Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* **34**, 2887-2905, (2006).
- 55 Hopfner, K. P., Gerhold, C. B., Lakomek, K. & Wollmann, P. Swi2/Snf2 remodelers: hybrid views on hybrid molecular machines. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 225-233,(2012).
- 56 Pyle, A. M. Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. *Annu Rev Biophys* **37**, 317-336, (2008).
- 57 Selby, C. P. & Sancar, A. Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J Biol Chem* **272**, 1885-1890 (1997).
- 58 Brosh, R. M., Jr. *et al.* The ATPase domain but not the acidic region of Cockayne syndrome group B gene product is essential for DNA repair. *Mol Biol Cell* **10**, 3583-3594 (1999).
- 59 Anindya, R. *et al.* A ubiquitin-binding domain in Cockayne syndrome B required for transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mol Cell* **38**, 637-648, (2010).
- 60 Colella, S., Nardo, T., Botta, E., Lehmann, A. R. & Stefanini, M. Identical mutations in the CSB gene associated with either Cockayne syndrome or the DeSanctis-cacchione variant of xeroderma pigmentosum. *Hum Mol Genet* **9**, 1171-1175, (2000).
- 61 Colella, S. *et al.* Alterations in the CSB gene in three Italian patients with the severe form of Cockayne syndrome (CS) but without clinical photosensitivity. *Hum Mol Genet* **8**, 935-941, (1999).
- 62 Jaakkola, E. *et al.* ERCC6 founder mutation identified in Finnish patients with COFS syndrome. *Clin Genet* **78**, 541-547, (2010).
- 63 Laugel, V. *et al.* Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum Mutat* **31**, 113-126, (2010).
- 64 Mallery, D. L. *et al.* Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. *Am J Hum Genet* **62**, 77-85, (1998).
- 65 Lake, R. J. & Fan, H. Y. Structure, function and regulation of CSB: a multi-talented gymnast. *Mech Ageing Dev* **134**, 202-211, (2013).
- 66 van den Boom, V. *et al.* DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J Cell Biol* **166**, 27-36,(2004).
- 67 Muftuoglu, M. *et al.* Cockayne syndrome group B protein has novel strand annealing and exchange activities. *Nucleic Acids Res* **34**, 295-304, (2006).
- 68 Beerens, N., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R., Vermeulen, W. & Wyman, C. The CSB protein actively wraps DNA. *J Biol Chem* **280**, 4722-4729, (2005).
- 69 Lake, R. J., Basheer, A. & Fan, H. Y. Reciprocally regulated chromatin association of Cockayne syndrome protein B and p53 protein. *J Biol Chem* **286**, 34951-34958, (2011).

- 70 Latini, P. *et al.* CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* **10**, 3719-3730, (2011).
- 71 Wong, H. K. *et al.* Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. *Nucleic Acids Res* **35**, 4103-4113, (2007).
- 72 Aamann, M. D. *et al.* Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *FASEB J* **24**, 2334-2346, (2010).
- 73 Kamenisch, Y. *et al.* Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *J Exp Med* **207**, 379-390, (2010).
- 74 Proietti-De-Santis, L., Drane, P. & Egly, J. M. Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J* **25**, 1915-1923, (2006).
- 75 Lake, R. J., Geyko, A., Hemashettar, G., Zhao, Y. & Fan, H. Y. UV-induced association of the CSB remodeling protein with chromatin requires ATP-dependent relief of N-terminal autorepression. *Mol Cell* **37**, 235-246, (2010).
- 76 Cho, I., Tsai, P. F., Lake, R. J., Basheer, A. & Fan, H. Y. ATP-dependent chromatin remodeling by Cockayne syndrome protein B and NAP1-like histone chaperones is required for efficient transcription-coupled DNA repair. *PLoS Genet* **9**, (2013).
- 77 Karve, T. & Cheema, A. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids* **2011**, (2011).
- 78 Imam, S. Z. *et al.* Cockayne syndrome protein B interacts with and is phosphorylated by c-Abl tyrosine kinase. *Nucleic Acids Res* **35**, 4941-4951, (2007).
- 79 Christiansen, M. *et al.* Functional consequences of mutations in the conserved SF2 motifs and post-translational phosphorylation of the CSB protein. *Nucleic Acids Res* **31**, 963-973 (2003).
- 80 Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* **43**, (2015).
- 81 Groisman, R. *et al.* CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev* **20**, 1429-1434, (2006).
- 82 Wei, L. *et al.* BRCA1 contributes to transcription-coupled repair of DNA damage through polyubiquitination and degradation of Cockayne syndrome B protein. *Cancer Sci* **102**, 1840-1847, (2011).
- 83 Ranes, M. *et al.* A ubiquitylation site in Cockayne syndrome B required for repair of oxidative DNA damage, but not for transcription-coupled nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* **44**, 5246-5255, (2016).
- 84 Thorslund, T. *et al.* Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* **25**, 7625-7636, (2005).
- 85 Bayer, P. *et al.* Structure determination of the small ubiquitin-related modifier

- SUMO-1. *J Mol Biol* **280**, 275-286, (1998).
- 86 Kamitani, T., Nguyen, H. P. & Yeh, E. T. Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J Biol Chem* **272**, 14001-14004 (1997).
- 87 Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Fukuda-Kamitani, T. & Yeh, E. T. Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* **273**, 11349-11353 (1998).
- 88 Chen, A., Mannen, H. & Li, S. S. Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes. *Biochem Mol Biol Int* **46**, 1161-1174 (1998).
- 89 Guo, D. *et al.* A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* **36**, 837-841, (2004).
- 90 Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. & Owerbach, D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* **279**, 27233-27238, (2004).
- 91 Saitoh, H. & Hinchev, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem.* , 275(279):6252-6258. (2000).
- 92 Wang, L. *et al.* SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep* **15**, 878-885, (2014).
- 93 Evdokimov, E., Sharma, P., Lockett, S. J., Lualdi, M. & Kuehn, M. R. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci* **121**, 4106-4113, (2008).
- 94 Zhang, F. P. *et al.* Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol* **28**, 5381-5390, (2008).
- 95 Gong, L., Li, B., Millas, S. & Yeh, E. T. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* **448**, 185-189, (1999).
- 96 Johnson, E. S. & Blobel, G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* **272**, 26799-26802 (1997).
- 97 Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L. S. & Yeh, E. T. Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J Biol Chem* **272**, 28198-28201 (1997).
- 98 Gareau, J. R. & Lima, C. D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 861-871, (2010).
- 99 Johnson, E. S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-382, (2004).
- 100 Yeh, E. T., Gong, L. & Kamitani, T. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* **248**, 1-14, (2000).
- 101 Gan-Erdene, T. *et al.* Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* **278**, 28892-28900, (2003).
- 102 Mendoza, H. M. *et al.* NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem* **278**, 25637-25643, (2003).
- 103 Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol* **8**, 947-956, (2007).
- 104 Rodriguez, M. S., Dargemont, C. & Hay, R. T. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**, 12654-12659, (2001).
- 105 Jang, M. S., Ryu, S. W. & Kim, E. Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 495-500, (2002).
- 106 Xirodimas, D. P., Chisholm, J., Desterro, J. M., Lane, D. P. & Hay, R. T. P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett* **528**, 207-211, (2002).
- 107 Comerford, K. M. *et al.* Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 986-991, (2003).
- 108 Tatham, M. H. *et al.* Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**, 35368-35374, (2001).
- 109 Miteva, M., Keusekotten, K., Hofmann, K., Praefcke, G. J. & Dohmen, R. J. Sumoylation as a signal for polyubiquitylation and proteasomal degradation. *Subcell Biochem* **54**, 195-214, (2010).
- 110 Kerscher, O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* **8**, 550-555, (2007).
- 111 Perry, J. J., Tainer, J. A. & Boddy, M. N. A simultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* **33**, 201-208, (2008).
- 112 RT, H. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* , 18(11):11-12 (2005).
- 113 Matunis, M. J., Coutavas, E. & Blobel, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-1470 (1996).
- 114 Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107, (1997).
- 115 Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. & Schar, P. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J* **21**, 1456-1464, (2002).
- 116 Steinacher, R. & Schar, P. Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol* **15**, 616-623, (2005).
- 117 Baba, D. *et al.* Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* **435**, 979-982, (2005).
- 118 Mao, Y., Desai, S. D. & Liu, L. F. SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* **275**, 26066-26073, (2000).
- 119 Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D. & Liu, L. F. SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4046-4051, (2000).
- 120 Rallabhandi, P. *et al.* Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem* **277**, (2002).

- 121 Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N. & Elledge, S. J. The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* **9**, 1169-1182, (2002).
- 122 Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141, (2002).
- 123 Papouli, E. *et al.* Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* **19**, 123-133, (2005).
- 124 Pfander, B., Moldovan, G. L., Sacher, M., Hoegel, C. & Jentsch, S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**, 428-433, (2005).
- 125 Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* **23**, 723-732, (2006).
- 126 Wang, Q. E. *et al.* DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* **33**, 4023-4034, (2005).
- 127 Akita, M. *et al.* SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Sci Rep* **5**, 10984, (2015).
- 128 Bergink, S. & Jentsch, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* **458**, 461-467, (2009).
- 129 Morris, J. R. *et al.* The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* **462**, 886-890, (2009).
- 130 Sacher, M., Pfander, B., Hoegel, C. & Jentsch, S. Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol* **8**, 1284-1290, (2006).
- 131 Torres-Rosell, J. *et al.* The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* **9**, 923-931, (2007).
- 132 Yurchenko, V., Xue, Z. & Sadofsky, M. J. SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **26**, 1786-1794, (2006).
- 133 Zhao, X. & Blobel, G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4777-4782, (2005).
- 134 Arakawa, H. *et al.* A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* **4**, e366, (2006).
- 135 Frampton, J. *et al.* Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **17**, 2976-2985, (2006).
- 136 Leach, C. A. & Michael, W. M. Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol* **171**, 947-954, (2005).

- 137 Parnas, O. *et al.* Elg1, an alternative subunit of the RFC clamp loader, preferentially interacts with SUMOylated PCNA. *EMBO J* **29**, 2611-2622,(2010).
- 138 Burgess, R. C., Rahman, S., Lisby, M., Rothstein, R. & Zhao, X. The Slx5-Slx8 complex affects sumoylation of DNA repair proteins and negatively regulates recombination. *Mol Cell Biol* **27**, 6153-6162, (2007).
- 139 Dou, H., Huang, C., Singh, M., Carpenter, P. B. & Yeh, E. T. Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex. *Mol Cell* **39**, 333-345, (2010).
- 140 Eladad, S. *et al.* Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* **14**, 1351-1365, (2005).
- 141 Kawabe, Y. *et al.* Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* **275**, 20963-20966, (2000).
- 142 Branzei, D. *et al.* Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* **127**, 509-522, (2006).
- 143 Jonkers, I., and Lis, J.T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Bio.* **16**, 167–177 (2015).
- 144 Lavigne, M., Konstantopoulos, D., Ntakou-Zamplara, K., Liakos, A., & Fousteri M., Global unleashing of transcription elongation waves in response to genotoxic stress restricts somatic mutation rate. *Nat Commun* **8**, 2076, (2017).
- 145 Troelstra, C. *et al.* ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* **71**, 939-953, (1992).
- 146 van Gool, A. J. *et al.* The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J* **16**, 5955-5965, (1997).
- 147 Francis, M. A. & Rainbow, A. J. UV-enhanced expression of a reporter gene is induced at lower UV fluences in transcription-coupled repair deficient compared to normal human fibroblasts, and is absent in SV40-transformed counterparts. *Photochem Photobiol* **72**, 554-561 (2000).
- 148 Nakazawa, Y., Yamashita, S., Lehmann, A. R. & Ogi, T. A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair (Amst)* **9**, 506-516, (2010).
- 149 Latonen, L., Taya, Y., & Laiho, M. UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* **20**, 6784-93, (2001).
- 150 Sherr, C., Cancer cell cycles. *Science* **274**:1672-7, (1996).
- 151 Dyson, N., The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-62. (1998).

- 152 Norbury, C., & Nurse, P., Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61**, 441-70, (1992).
- 153 Watanabe, N., Broome, M., & Hunter, T., Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* **14**, 1878-91, (1995).
- 154 Elledge, S., Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**:1664-72., (1996).
- 155 Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai K., & Elledge, S., Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10389-94., (2000).
- 156 Tibbetts, R., Brumbaugh, K., Williams, J., Sarkaria, J., Cliby, W., Shieh, S., Taya Y., Prives, C., & Abraham, R., A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**, 152-7. (1999) .
- 157 Sin, Y., Tanaka, K., & Saijo, M., The C-terminal Region and SUMOylation of Cockayne Syndrome Group B Protein Play Critical Roles in Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair. *J Biol Chem* **291**, 1387-97, (2016).
- 158 McKay, B., Becerril, C., Spronck J., & Ljungman, M., Ultraviolet light-induced apoptosis is associated with S-phase in primary human fibroblasts. *DNA Repair* **1**, 811-20, (2002).
- 159 Brambati, A., Colosio, A., Zardoni, L., Galanti L., & Liberi, G., Replication and transcription on a collision course: eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability. *Front Genet* **6**, 2015.

Ευρετήριο Συντμήσεων

- **AOS1** **Activation of Smt3p involved protein**
- **ATM** **Ataxia telangiectasia mutated**
- **ATP** **Adenosine triphosphate**
- **ATR** **Ataxia telangiectasia and Rad3 related**
- **BER** **Base excision repair**
- **BglII** **Bacillus globigii**
- **BLM** **Bloom syndrome protein**
- **BRCA1** **Breast cancer type 1**
- **CDC2 ή CDK1** **Cell Division Cycle protein 2**
- **Cdk7** **Cyclin Dependent Kinase 7**
- **cDNA** **complementary DNA**
- **ChIP** **Chromatin ImmunoPrecipitation**
- **CHK1/2** **Checkpoint kinase 1/2**
- **Cis-pt** **Cisplatin**
- **CMV** **Cytomegalovirus**
- **COFS** **Cerebro Oculo Facio Skeletal Syndrome**
- **CPDs** **Cyclobutane Pyrimidine Dimers**
- **CS** **Cockayne Syndrome**
- **CSA** **Cockayne Syndrome protein A**
- **CSB** **Cockayne Syndrome protein B**
- **CSB^{-/-} sv40** **αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος από ασθενείς με σύνδρομο Cockayne**
- **CSB^{ΔSUMO} sv40** **αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος από ασθενείς με σύνδρομο Cockayne, τριπλά μεταλλαγμένοι στις θέσεις SUMOυλίωσης (K32, K238, K481)**
- **CTD** **Carboxy-terminal domain**
- **DAPI** **4',6-diamidino-2-phenylindole**
- **DAXX** **Death-associated protein 6**
- **DDB1/DDB2** **DNA-damage binding protein 1/2**
- **DMEM** **Dulbecco's Modified Eagle Medium**
- **DNA** **DeoxyriboNucleic Acid**
- **DNA-PK** **DNA-dependent protein kinase**
- **DRB** **5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole**

- **DSB d** Double strand breaks
- **DSIF** DRB Sensitivity- Inducing Factor
- **DTT** Dithiothreitol
- **EDTA** Ethylenediaminetetraacetic acid
- **EGTA** Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
- **EI** Escape Index
- **ERCC1/2/5/6/8** Excision Repair Cross Complementation Group 1/2/5/6/8
- **EU** Ethylene Uridine
- **FACs** Fluorescence-activated cell sorter
- **FBS** Fetal Bovine Serum
- **GAPDH** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- **GFP** Green fluorescent protein
- **GG-NER ή GGR** Global Genome Repair
- **G418** Geneticin
- **HA-CSB sv40** αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος από ασθενείς με σύνδρομο CS στους οποίους έχει προστεθεί η λειτουργική πρωτεΐνη CSB, σημασμένη με μία μικρή ακολουθία
- **HMGN1** High Mobility Group Nucleosome binding 1
- **IP** Immunoprecipitation
- **LMNA2** Lectin, Mannose Binding 2
- **MDM2** Mouse double minute 2 homolog
- **MRC5 sv40** φυσιολογικοί αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος
- **mRNA- seq** messenger RNA sequencing
- **NaPy** Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate
- **NAP1** Nucleosome Assembly Protein 1
- **NELF** Negative Elongation Factor
- **NER** Nucleotide Excision Repair, Μηχανισμός Εκτομής Νουκλεοτιδίων
- **NFAT5** Nuclear factor of activated T-cells 5
- **PARP1** Poly [ADP-ribose] polymerase 1
- **PBS** Phosphate-buffered saline
- **PCR/RTPCR/qPCR** Real-time/ quantitative polymerase chain reaction
- **Pen Strep** Penicillin Streptomycin
- **PIAS1** Protein inhibitor of activated STAT
- **PML** promyelocytic leukemia protein

- **PMSF** **Phenylmethylsulfonyl fluoride**
- **p-PEI** **polyethylenimine (transfection protocol)**
- **P-TEFb** **Positive Transcription Elongation Factor b**
- **PCNA** **Proliferating Cell Nuclear Antigen**
- **Pc2** **Polycomb protein 2**
- **PPP** **Proximal Promoter Pausing Sites**
- **p300** **Protein 300**
- **p53** **Tumor Protein 53**
- **RANBP2** **RAN binding protein 2**
- **RASSF8** **Ras Association Domain Family Member 8**
- **Rb** **Retinoblastoma**
- **RBX1** **RING-box protein 1**
- **RFC** **Replication Factor C**
- **RNA** **RiboNucleic Acid, ριβονουκλεϊκό οξύ**
- **RNAPOLII** **RNA polymerase II RNA πολυμεράση II**
- **RNAPII-Ser2P** **Serine 2- phosphorylated RNA polymerase II**
- **RPA** **Replication Protein A**
- **SAE1/2** **SUMO-activating enzyme subunit 1 /2**
- **SENp** **Sentrin-specific protease**
- **SGS1** **Slow Growth Suppressor 1**
- **SIK3/STK3** **Serine/threonine-protein kinase 3**
- **SIM** **Sumo Interacting Motif**
- **SSC** **Saline-sodium citrate**
- **SUMO** **Small Ubiquitin Modifier**
- **TC- NER ή TCR** **Transcription-Coupled Repair**
- **TDG** **Thymine DNA glycosylase**
- **TFIIS** **Transcription factor II S**
- **TFIIH** **Transcription factor II H**
- **TOPI/II** **Topoisomerase I/II**
- **TSS** **Transcription Start Site**
- **TTD** **Trichothiodystrophy**
- **TTDN1** **TTD non-photosensitive 1 protein**
- **Ubc9** **Ubiquitin Conjugating Enzyme 9**
- **UBD** **Ubiquitin Binding Domain**

- **UV-C** **Ultraviolet-C irradiation, υπεριώδης ακτινοβολία**
- **UVSSA** **UV- stimulated scaffold protein A**
- **USP7** **Ubiquitin- specific- processing protease 7**
- **VH10 hTERT** **φυσιολογικοί αθανατοποιημένοι ινοβλάστες δέρματος**
- **WRN** **Werner syndrome protein**
- **WT** **Wild type**
- **XP** **Xeroderma pigmentosum**
- **XPA/ XPB/ XPC/ XPD/ XPE/ XPF/ XPG/ XPV** **Xeroderma Pigmentosum protein A, B, C, D, E, F, G, V**
- **XAB2** **XPA binding protein 2**
- **XRCC4** **X-ray repair cross-complementing protein 4**
- **6-4PPs** **6-4 pyrimidine pyrimidine photoproducts**

