



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας
των τελομερών στη νεοπλασία*

*Investigation of the structure and
function of telomeres in neoplasia*

ΕΥΜΟΡΦΟΠΟΥΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

Επιβλέπων καθηγητής:

ΓΚΑΓΚΟΣ ΣΑΡΑΝΤΗΣ

Λάρισα 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

❖ Δρ. Σαράντης Γκάγκος (επιβλέπων)

Ερευνητής Β' στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
(Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.)

❖ Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός

Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

❖ Δρ. Επαμεινώντας Δοξάκης

Ερευνητής Γ' στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
(Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την επίβλεψη του ερευνητή Δρ. Σαράντη Γκάγκου. Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γκάγκο για τη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως μέλη της επιτροπής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Νικόλαο Μπαλατσό, καθώς και τον ερευνητή κ. Ελαμεινώντα Δοξάκη.

Επίσης, ευχαριστώ την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Veronica Cherdyntseva για τις πολύτιμες συμβουλές που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Wojciech Niedzwiedz, ερευνητή του Institute of Cancer Research (ICR), για τη συνεργασία του και τη συμβολή του στη μελέτη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|--------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | - 6 - |
| ABSTRACT | - 7 - |
| I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | - 8 - |
| 1. ΤΕΛΟΜΕΡΗ | - 8 - |
| 1.1. ΓΕΝΙΚΑ | - 8 - |
| 1.2. ΤΟ ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΑΚΟ DNA | - 10 - |
| 1.3. ΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ | - 14 - |
| 1.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ | - 19 - |
| 1.5. ΤΕΛΟΜΕΡΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ | - 20 - |
| 1.6. ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ | - 34 - |
| 2. EXD2 (Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2) | - 40 - |
| II. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | - 41 - |
| III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | - 41 - |
| 1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ | - 41 - |
| 1.1. ΑΠΟΨΥΞΗ ΠΑΓΩΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | - 42 - |
| 1.2. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | - 43 - |
| 1.3. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ / ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ | - 44 - |
| 2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΕΤΑΦΑΣΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ | - 44 - |
| 3. ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ (IF - ImmunoFluorescence) | - 45 - |
| 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΑ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ (FISH - Fluorescence In Situ Hybridization) | - 47 - |
| 4.1. ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (PNA-FISH) | - 47 - |
| 4.2. ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΣΕ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ND - FISH) | - 49 - |
| 4.3. ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΥ (CO - FISH) | - 50 - |

| | |
|--|--------|
| 5. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ | - 52 - |
| IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | - 53 - |
| 1. Η ΕΞΩΝΟΥΚΛΕΑΣΗ EXD ₂ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΠΥΡΗΝΕΣ ΤΩΝ U ₂ OS ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ | - 53 - |
| 2. Ο ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ EXD ₂ ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ | - 55 - |
| 3. Η EXD ₂ ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ | - 58 - |
| 4. Η EXD ₂ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΝ ΚΛΑΣΣΙΚΟ ΟΜΟΛΟΓΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ | - 61 - |
| V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | - 64 - |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | - 67 - |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δομή των τελομερών και ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν αποτελούν τη βάση της τελομερικής βιολογίας. Το τελομερές είναι μία νουκλεοπρωτεϊνική περιοχή στα άκρα κάθε χρωμοσώματος και αποτελείται από δίκλωνες επαναλαμβανόμενες εξανουκλεοτιδικές αλληλουχίες TTAGGG / AATCCC [10]. Το μονόκλωνο 3' άκρο, στο οποίο καταλήγει κάθε τελομερές, οργανώνεται έτσι ώστε να δημιουργηθεί η θηλειά T, η οποία συγκροτείται από τη σελτερίνη [26, 34], ένα πρωτεϊνικό εξαμερές σύμπλοκο (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, POT1) που διατηρεί σταθερή τη δομή του τελομερούς, με σκοπό να μην αναγνωρίζεται το τελομερές από τους παράγοντες DDR [28]. Αντίθετα, ένα δυσλειτουργικό τελομερές αποτελεί στόχο των ATM και ATR κινασών [112]. Η αναγνώριση αυτή προκαλεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων, που οδηγεί ψευδώς στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA [28]. Με την πάροδο των ετών, τα τελομερή μειώνονται σε μήκος. Αν κάποιο κύτταρο καταφέρει και ξεπεράσει το στάδιο της αντιγραφικής γήρανσης, απενεργοποιώντας την p53, τότε φτάνει σε μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο, πολύ μικρά και δυσλειτουργικά τελομερή [123 - 125]. Όμως, κάποια κύτταρα ενεργοποιούν μηχανισμούς επιμήκυνσης των τελομερών τους, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν της κρίσης και να αθανατοποιούνται [126]. Η επιμήκυνση μπορεί να γίνει μέσω της τελομεράσης ή με τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) [127]. Ο ALT μηχανισμός σχετίζεται άμεσα με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, καθώς για να πραγματοποιηθεί η επιμήκυνση του τελομερούς, απαιτείται η σύνδεση του μονόκλωνου 3' - τελομερικού άκρου σε μία συμπληρωματική αλληλουχία. Συνεπώς, ο ALT χρησιμοποιεί μηχανισμούς που εξαρτώνται από ομόλογες αλληλουχίες [150]. Για αυτό το λόγο, μόρια που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA είναι πολύ σημαντικά για τον ALT και κατά συνέπεια για την επιμήκυνση του εκάστοτε τελομερούς. Ένα από τα μόρια αυτά είναι η EXD2, η οποία λειτουργεί ως εξωνουκλεάση 3' -> 5', συνεργατικά με το σύμπλοκο MRN [161]. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η EXD2 λειτουργεί και στο τελομερές, τόσο στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όσο και στον ALT.

ABSTRACT

The structure of telomeres and their mode of operation form the basis of telomere biology. A telomere is a region at the ends of each chromosome and is consisted of double-stranded hexagonucleotide repeated sequences TTAGGG / AATCCC [10]. The single-stranded 3' **end, to which each telomere** is terminated, is organized to create the T-loop, which is conserved by Shelterin [26, 34]. Shelterin is a six-protein complex (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, POT1) which maintains the structure of the telomere, in order to **prevent telomere's recognition from DDR factors [28]**. Otherwise, a dysfunctional telomere will be targeted by ATM and ATR kinases [112]. This recognition causes a reaction cascade, which falsely leads to the activation of DNA repair mechanisms [28]. Over the years, telomere length is reduced. If a cell overcomes the "*replication senescence*" stage through deactivation of p53, it reaches a state characterized by massive cell death, very small and dysfunctional telomeres [123-125]. However, some cells activate mechanisms to lengthen their telomeres, resulting in survival and immortality [126]. Elongation can be achieved by telomerase or an alternative telomere elongation mechanism (ALT) [127]. The ALT mechanism is directly related to the DNA repair mechanisms. In order to carry out elongation of the telomere through the ALT, the single-**stranded 3' end of the telomere** requires a complementary sequence. Therefore, ALT uses mechanisms that can provide homologous sequences [150]. Thus, molecules involved in DNA repair mechanisms are very important for ALT and elongation of the telomere consequently. One of these molecules is EXD2, which operates as an exonuclease 3' → 5', cooperatively with the MRN complex [161]. Our results demonstrate that EXD2 has the same function in telomeres, both in repair mechanisms and in ALT.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΤΕΛΟΜΕΡΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

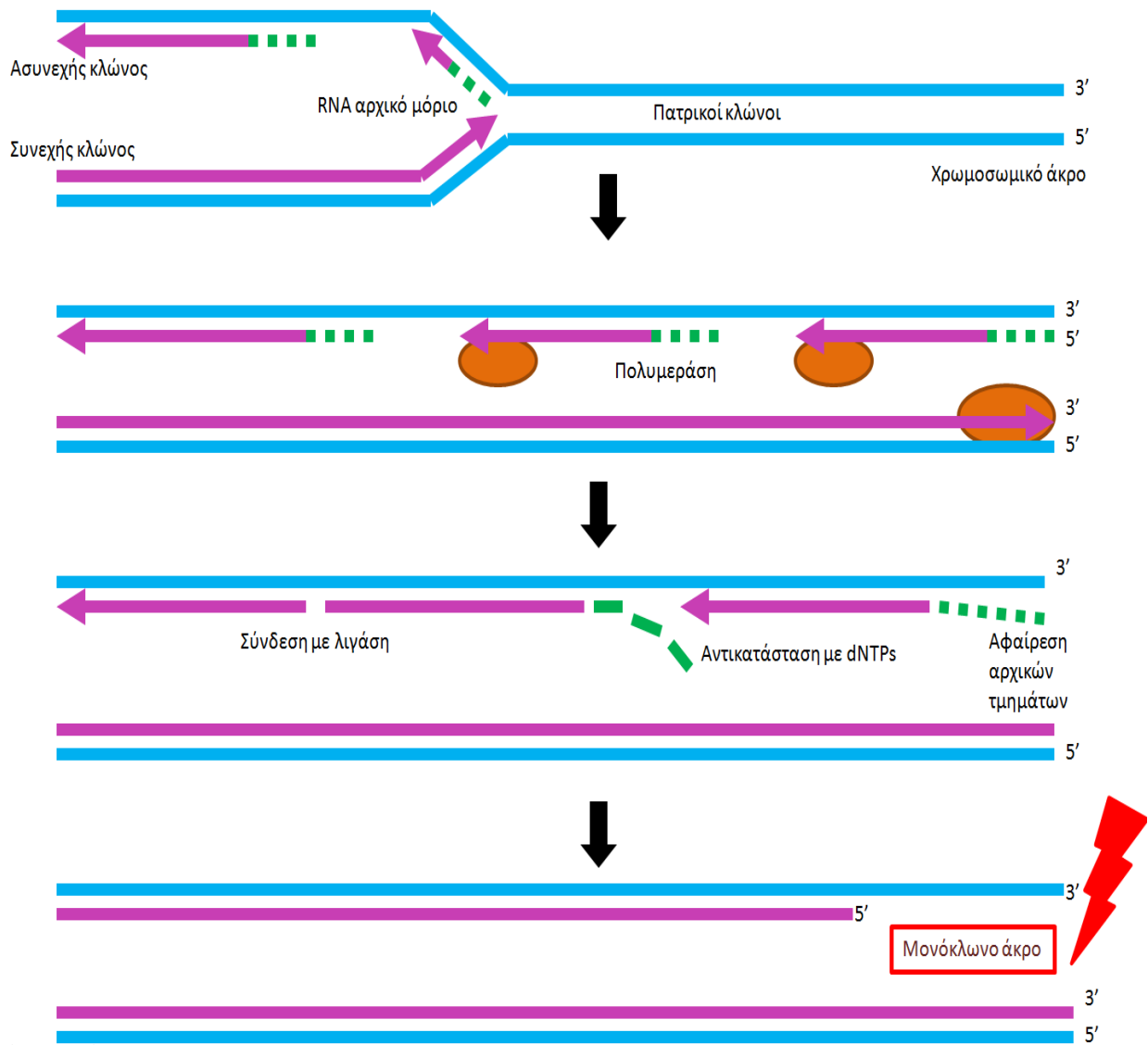
Η απαρχή της ζωής κάθε οργανισμού ορίζεται από το γενετικό του υλικό. Το γενετικό υλικό αυτό μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο, κυκλικό ή γραμμικό. Η πλειονότητα των οργανισμών διαθέτει ως γενετικό υλικό τη δίκλωνη μορφή, δηλαδή το DNA. Στους ευκαρύωτες, το αρχέγονο κυκλικό χρωμόσωμα εξελίχθηκε σε μικρά γραμμικά χρωμοσώματα, των οποίων το μήκος και ο αριθμός διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών [1, 2]. Κάθε γραμμικό χρωμόσωμα όμως καλείται να επιλύσει 3 βασικά προλήματα, προκειμένου να προσαρμοστεί και να διατηρηθεί ακέραιο.

Τα προβλήματα αυτά οφείλονται σε ένα φαινόμενο που περιγράφηκε από τους Watson και Olovnikov και ονομάστηκε “*chromosome end-replication problem*”. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, κάθε αλυσίδα της δίκλωνης έλικας λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Έτσι, με τον ημισυντηρητικό τρόπο αντιγραφής του DNA, από ένα δίκλωνο μόριο προκύπτουν δύο νέα, καθένα από τα οποία αποτελείται από ένα πατρικό και ένα νεοσυντιθέμενο κλώνο.

Από την απομόνωση των DNA πολυμερασών, προέκυψε ότι τα ένζυμα αυτά εκτελούν την αντιγραφή του DNA, δρουν μόνο με κατεύθυνση 5' προς 3' και δεν μπορούν να ξεκινήσουν τη διαδικασία της αντιγραφής *de novo*. Η αδυναμία των συγκεκριμένων ενζύμων προκύπτει από το γεγονός ότι χρειάζονται ένα ελεύθερο 3' - άκρο για να αλληλεπιδράσουν, να συνδεθούν και να αρχίσουν την τοποθέτηση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Συνεπώς, η λύση είναι αρκετά απλή. Ολιγονουκλεοτιδικές RNA αλληλουχίες συντίθενται ύστερα από δράση του πριμοσώματος. Τα RNA τμήματα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται από την DNA πολυμεράση, η οποία είναι πλέον ικανή να ξεκινήσει την αντιγραφή του κλώνου επιμηκύνοντάς τα και τοποθετώντας αντί για ριβονουκλεοτίδια, δεοξυριβονουκλεοτίδια. Η ύπαρξη όμως μικτών DNA-RNA τμημάτων διακυβεύει την ακεραιότητα της δίκλωνης έλικας. Συνεπώς, τα τμήματα RNA απομακρύνονται και τη θέση τους καταλαμβάνουν

δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα οποία τοποθετούνται σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας από την αρμόδια DNA πολυμεράση.

Το πρόβλημα της αντιγραφής έγκειται στο 5'- άκρο του νεοσυντιθέμενου ασυνεχούς κλώνου, στο οποίο μετά την αφαίρεση του ολιγοριβονουκλεοτιδικού τμήματος καθιστάται αδύνατη η δράση της DNA πολυμεράσης. Κατά συνέπεια, σε κάθε τέλος αντιγραφής προκύπτει ένα μονόκλωνο 3' – άκρο σε κάθε χρωμόσωμα και τμήμα του 5' – άκρου χάνεται . Το αποτέλεσμα αυτής της αδυναμίας είναι η σταδιακή μείωση του χρωμοσώματος τόσο σε μήκος, όσο και σε πληροφορία [3 - 6]. Επίσης, η ύπαρξη μονόκλωνου άκρου ενεργοποιεί είτε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA [7, 8], είτε τη δράση εξωνουκλεασών [9] (Εικόνα 1). Η επίλυση αυτών των προλημάτων προκύπτει από την ύπαρξη των τελομερών στα άκρα κάθε γραμμικού χρωμοσώματος.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA και του προβλήματος που προκύπτει από αυτή. Η εξέλιξη των κυκλικών χρωμοσωμάτων σε γραμμικά έθεσε το πρόβλημα της αντιγραφής, κατά το οποίο μετά το τέλος ενός κύκλου αντιγραφής αφήνεται ένα μονόκλωνο 3' - άκρο σε κάθε χρωμόσωμα. Το άκρο αυτό αποτελεί σήμα καταστροφής του DNA (DDR: DNA damage response), οπότε ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης ή γίνεται στόχος εξωνουκλεασών προς καταστροφή του.

1.2. ΤΟ ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΑΚΟ DNA

Τα κάθε άκρο ενός γραμμικού χρωμοσώματος τερματίζει σε μία νουκλεοπρωτεϊνική περιοχή από επαναμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Το σύνολο των επαναλαμβανόμενων εξανουκλεοτιδικών αλληλουχιών συνιστά ένα τελομερές. Τα τελομερή πρωτοανακαλύφθηκαν στα

τέλη του 1930' στις μύγες από τον Herman Muller και στη συνέχεια στο καλαμπόκι από την Barbara McClintock [10]. Η ανακάλυψη νέων μοριακών τεχνολογιών έθεσε τα θεμέλια για τη λεπτομερή μελέτη των τελομερών. Η Elizabeth Blackburn, μεταδιδακτορική φοιτήτρια τότε στο εργαστήριο του Joseph Gall, αλληλούχησε ριβοσωμικά μόρια DNA από μακροπυρήνες *Tetrahymena* και παρατήρησε ότι σε κάθε χρωμόσωμα εμπεριέχονται μη κωδικοποιησιμες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5' – TTGGGG – 3' σε κάθε άκρο. Η αλληλουχία αυτή επαναλαμβανόταν περίπου 50 φορές στο κάθε άκρο, αλλά ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν διαφορετικός σε κάθε χρωμόσωμα [11]. Στη συνέχεια, ο David Prescott μελέτησε μία άλλη ομάδα βλεφαριδοφόρων, στο γονιδίωμα των οποίων ανακάλυψε επίσης επαναλαμβανόμενες μη κωδικοποιησιμες αλληλουχίες με διαφορετική νουκλεοτιδική ακολουθία αυτή τη φορά. Τα συγκεκριμένα τελομερή αποτελούνταν από επαναλήψεις της αλληλουχίας 5' – TTTTGGGG – 3' [12]. Το ακριβές μέγεθος των τελομερών αυτών βοήθησε στο να προσδιοριστεί η διαφορά μεγέθους μεταξύ του δύο κλώνων. Δηλαδή, ο κλώνος που ήταν πλούσιος σε γουανίνες ήταν μεγαλύτερος σε μέγεθος συγκριτικά με τον συμπληρωματικό του που ήταν πλούσιος σε κυτοσίνες. Κάθε χρωμόσωμα λοιπόν αποτελείται από ένα μονόκλωνο 3' - άκρο πλούσιο σε γουανίνες [13].

1.2.1. Οι τελομερικές 5' - TTAGGG - 3' αλληλουχίες

Τα τελομερή μελετήθηκαν σε διάφορους οργανισμούς – μοντέλα. Τη βάση όμως για τη μελέτη τους στους ευκαρύωτες και κατ' επέκταση στα θηλαστικά έθεσε η ανακάλυψή τους στα ευκαρυωτικά βλεφαριδοφόρα. Γενικά, η αλληλουχία του εκάστοτε τελομερούς εμφανίζει διαφοροποιήσεις μεταξύ των οργανισμών. Επίσης, ο αριθμός των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων που συνιστούν ένα τελομερές διαφέρει τόσο μεταξύ των οργανισμών από 20 βάσεις μέχρι και μερικές δεκάδες κιλοβάσεις, όσο και μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων σε ένα μόνο οργανισμό. Το 1989, ο Morin έδειξε ότι η αρχική εξανουκλεοτιδική αλληλουχία στον άνθρωπο είναι η 5' – TTAGGG – 3', ενώ στη συνέχεια απέδειξε ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι υψηλά διατηρημένη μεταξύ των θηλαστικών [14, 15]. Ο μεγάλος βαθμός συντήρησης της συγκεκριμένης αλληλουχίας μεταξύ των ειδών - από τα κοράλια μέχρι και

τον άνθρωπο - υποδηλώνει ότι η ομοιότητα των τελομερών είναι υπό την επιτήρηση πολύ καλά συντηρημένων βιολογικών μονοπατιών [16-19]. Όμως, παρόλο που η αλληλουχία παραμένει κοινή στη συντριπτική πλειοψηφία των οργανισμών, ο αριθμός των επαναλήψεων αυτής της αλληλουχίας διαφέρει ακόμη και μεταξύ των θηλαστικών. Για παράδειγμα, το μήκος των τελομερών τρωκτικών κειμένεται από 50 – 150 κιλοβάσεις, ενώ στον άνθρωπο τα τελομερή έχουν μήκος 15 – 20 κιλοβάσεις κατά τη γέννηση και σταδιακά μειώνονται [15, 20, 21].

1.2.2. Το τελομερικό άκρο

Η πρωτοταγής δομή του τελομερούς αποτελείται από μία σειρά δίκλωνων αλληλουχιών TTAGGG / AATCCC, οι οποίες δεν καταλήγουν σε τυφλά άκρα, αλλά σε ένα μονόκλωνο 3' - άκρο. Το μονόκλωνο αυτό άκρο είναι πλούσιο σε γουανίνες, καθώς αποτελείται επίσης από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5' - TTAGGG - 3', όμως το μήκος του είναι σημαντικά μικρότερο από το δίκλωνο τμήμα του υπόλοιπου τελομερούς και κειμένεται μεταξύ 30 έως 600 νουκλεοτιδίων στα θηλαστικά [15, 22, 23]. Το μήκος του είναι σημαντικά μεγαλύτερο στα θηλαστικά συγκριτικά με τους υπόλοιπους ευκαρύωτες. Παρότι η ύπαρξη του στο τελομερές είναι δεδομένη, δεν έχει βρεθεί ο μηχανισμός με τον οποίο δημιουργείται. Όμως, πιστεύεται ότι είναι προϊόν δράσης της τελομεράσης [24, 25] (Εικόνα 2).

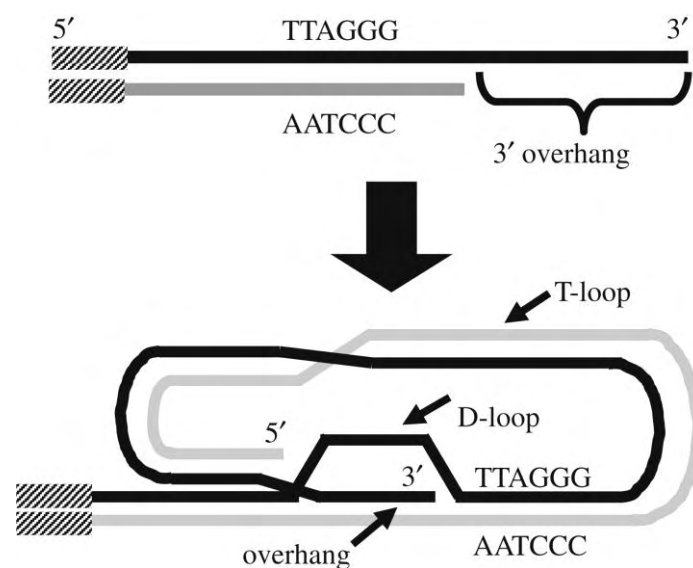


Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των τελομερικών αλληλουχιών στα τρωκτικά. Το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5' - TTAGGG - 3' που φτάνουν σε μήκος 50 - 150 kb, ενώ ο βρόγχος G έχει μήκος 30 - 600 bp. [P Kroustallaki, S Gagos (2015) Structure and Functions of Telomeres in Organismal Homeostasis and Disease Genomic Elements in Health, Disease and Evolution, Springer New York.]

1.2.3. Η T - θηλεία

Το μονόκλωνο άκρο του τελομερούς, που προαναφέρθηκε, θα ήταν απροστάτευτο αν παρέμενε σε αυτή τη μορφή. Στη μονόκλωνη μορφή του θα αποτελούσε στόχο εξωνουκλεασών ή άλλων ενζύμων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα είτε την αποικοδόμησή του, είτε τη συνεχή δράση των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Για το λόγο αυτό, το μονόκλωνο άκρο οργανώνεται και εισχωρεί μέσα στη διπλή έλικα του DNA -στο τελομερικό τμήμα- δημιουργώντας μία θηλεία T [26]. Μετά την εισχώρηση του μονόκλωνου G - rich άκρου, δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ αυτού και του συμπληρωματικού κλώνου της δίκλωνης έλικας, δηλαδή αυτού που είναι πλούσιος σε κυτοσίνες. Η νέα σύνδεση προκαλεί τοπική εκτόπιση της συμπληρωματικής αλυσίδας που ήταν συνδεδεμένη εκεί προηγουμένως, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία θηλεία D αυτή τη φορά [26] (Εικόνα 3).

Το μέγεθος της θηλείας T διαφέρει μεταξύ των τελομερών ακόμη και στο ίδιο κύτταρο, αλλά δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη λειτουργία του τελομερούς [27]. Επίσης, παρόλο που έχουν βρεθεί τα πρωτεϊνικά συστατικά που σταθεροποιούν τη δομή αυτή, δεν είναι γνωστό πως ή πότε δημιουργείται από τις τελομερικές πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [28].



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός τελομερούς. Ο βρόγχος G «κρύβεται» εντός της διπλής έλικας και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το συμπληρωματικό του κλώνο, σχηματίζοντας την

θηλειά Τ. Παράλληλα, εκτοπίζοντας τον πλούσιο σε γουανίνες κλώνο (G - rich strand), δημιουργείται μία θηλειά D. [Lai TP, Wright WE, Shay JW, *Comparison of telomere length measurement methods*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018 Mar 5;373(1741)]

1.3. ΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

Το τελομερές προστατεύεται μέσω της διαμόρφωσης που αποκτά στο χώρο. Η θηλειά Τ, που προαναφέρθηκε, συγκροτείται με τη βοήθεια πρωτεϊνικών συμπλόκων και άλλων πρωτεϊνών. Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο που κατ' εξοχήν συμβάλλει στην ακεραιότητα του τελομερούς ονομάζεται σελτερίνη. Παράλληλα όμως, άλλα δομικά πρωτεϊνικά μόρια εντοπίζονται στις τελομερικές αλληλουχίες και έχουν ως στόχο τη διατήρηση και τη σωστή λειτουργία του τελομερούς [29].

1.3.1. Τα τελομερικά νουκλεοσώματα

Το 80% του γενωμικού DNA αλληλεπιδρά και πακετάρεται με τη βοήθεια ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, που ονομάζεται νουκλεόσωμα. Τα νουκλεοσώματα αποτελούνται από ένα τμήμα DNA περιελυγμένο γύρω από ένα οκταμερές ιστονών (δύο αντίγραφα από τις H2A, H2B, H3 και H4 ιστόνες) [30]. Η ύπαρξη των νουκλεοσωμάτων δεν έχει μόνο δομικό χαρακτήρα, αλλά συμβάλει και λειτουργικά στη δυναμική διάφορων βιολογικών διεργασιών, όπως για παράδειγμα στην έκφραση γονιδίων ή στην επιδιόρθωση του DNA [31].

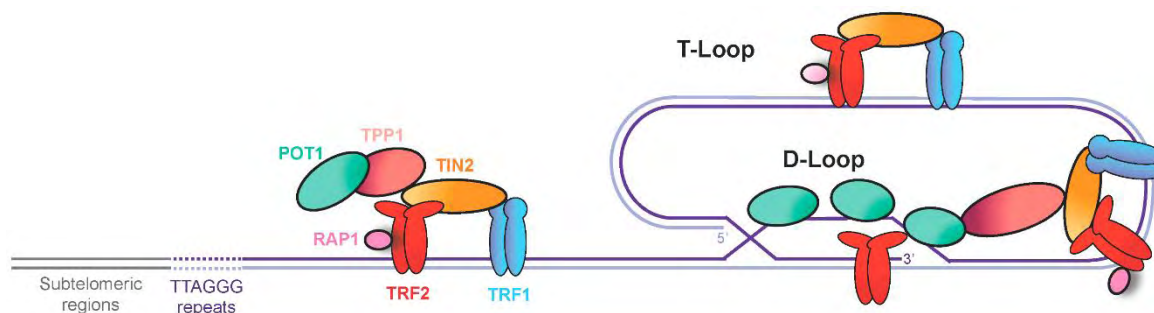
Τα τελομερικά νουκλεοσώματα είναι μορφολογικά ίδια με εκείνα που πακετάρουν το υπόλοιπο γενωμικό DNA, δεν υπάρχουν όμως σε όλα τα είδη οργανισμών. Το 1992, βρέθηκε ότι οι κατώτεροι ευκαρύωτες δεν διαθέτουν νουκλεοσώματα στα τελομερή τους σε αντίθεση με τους ανώτερους ευκαρύωτες [32]. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο, βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος του τελομερούς διαθέτει νουκλεοσώματα, τα οποία είναι κοντά τοποθετημένα μεταξύ τους, όμως υπάρχει μία περιοχή στο τέλος της δικλωνής αλληλουχίας του τελομερούς όπου το DNA δεν είναι πακεταρισμένο. Επίσης, στην ίδια έρευνα διαπιστώθηκε ότι σε κυτταρικές σειρές HeLa με διαφορές

στα μήκη των τελομερών τους, τα κύτταρα με τα μεγαλύτερα μήκη τελομερών διέθεταν ισχυρά πακεταρισμένο τελομερικό DNA, σε αντίθεση με εκείνα που είχαν πολύ μικρότερο μήκος τελομερών. Συνεπώς, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το τελομερικό DNA ξεκινάει με έναν υψηλό βαθμό πακεταρίσματος, λόγω των νουκλεοσωμάτων, αλλά καταλήγει σε μία ελαφρώς διαφοροποιημένη δομή που μοιάζει με την απλή χρωματίνη. Η ακριβής δομή και οι αποστάσεις δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστούν, καθώς ο μεγάλος αριθμός των επαναλήψεων που διαθέτει ένα τελομερές μειώνει την ευαισθησία της μεθόδου [33].

1.3.2. Η Σελτερίνη

Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5' - TTAGGG - 3' των χρωμοσωμικών άκρων αλληλεπιδρούν με ένα σύμπλοκο έξι πρωτεϊνών που ονομάζεται σελτερίνη [34]. Η σελτερίνη βοηθάει τα κύτταρα να διατηρήσουν την ακεραιότητα των τελομερών τους τόσο δομικά, όσο και λειτουργικά, αποφεύγοντας τη λανθασμένη αντίληψή τους από το κύτταρο ως σήματα επιδιόρθωσης κάποιας βλάβης, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ενώ παράλληλα καθορίζει και το τελομερικό μήκος. Τα μόρια της σελτερίνης που παρευρίσκονται σε ένα τελομερές σχετίζονται με το μήκος του, και βρίσκονται σε περίσσεια στην τελομερική περιοχή καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες που συγκροτούν τη σελτερίνη έχουν εξειδικευμένη δράση στο τελομερές και μέχρι στιγμής δεν έχει δειχθεί να εντοπίζονται σε μη τελομερική περιοχή και σε κανένα άλλο σημείο του πυρήνα εν γένει [28].

Η σελτερίνη αποτελείται από τα εξής πρωτεϊνικά μόρια: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 και POT1. Η εξειδικευμένη σύνδεσή της στο τελομερές οφείλεται στα τρία από τα έξι συστατικά που τη συγκροτούν. Οι πρωτεΐνες TRF1, TRF2 και POT1 διαθέτουν μια περιοχή αναγνώρισης των αλληλουχιών 5' - TTAGGG - 3' στο μονόκλωνο ή δίκλωνο τμήμα του τελομερούς και παράλληλα λειτουργούν ως «διαμεσολαβητές» για την προσέλευση και σύνδεση των υπόλοιπων πρωτεϊνών (TIN2, Rap1 και TPP1) [28] (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της δομής του τελομερούς και τον καθορισμού του μήκους του. Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται σελτερίνη και αποτελείται από έξι πρωτεϊνικά μόρια TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 και POT1. [Maestroni L., Matmati S., Coulon S. *Solving the Telomere Replication Problem*. Genes (Basel). 2017 Feb; 8(2): 55.]

1.3.2.1. Οι υπομονάδες της Σελτερίνης: TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1, POT1

TRF1

Η πρωτεΐνη TRF1 είναι η πρώτη τελομερική πρωτεΐνη που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε σχετικά με την εξειδικευμένη ικανότητά της να συνδέεται στις αλληλουχίες 5' - TTAGGG - 3' των τελομερών στα σπονδυλωτά, το 1995 [35]. Ως πρωτεϊνικό στοιχείο της σελτερίνης συμβάλλει στη διατήρηση και προστασία του τελομερικού άκρου, ενώ παράλληλα ρυθμίζει και το μήκος του.

Η TRF1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *TERF1* στον άνθρωπο και εμφανίζεται ως ομοδιμερές ή ολιγοδιμερές. Το μήκος της είναι 439 αμινοξέα [36]. Στο καρβοξυ – τελικό άκρο της, στη θέση 375 - 432, εντοπίζεται μία περιοχή σύνδεσης με το DNA της μορφής έλικα – στροφή – έλικα (H - T - H Myb motif), η οποία έχει μήκος 58 αμινοξέων. Επίσης, στη θέση 58 - 268 έχει μία περιοχή διμερισμού TRFH, η οποία διευκολύνει την αλληλεπίδραση με την TIN2, πρωτεΐνη που θα περιγραφεί στη συνέχεια [28] (Εικόνα 5).

TRF2

Η πρωτεΐνη TRF2 περιγράφηκε ως ομόλογη της TRF1 το 1997 [37, 38]. TRF2 και TRF1 μοιράζονται κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Όμως, δεν έχει παρατηρηθεί άμεση αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

Η TRF2 κωδικοποιείται από το γονίδιο *TERF2* στον άνθρωπο και αποτελεί επίσης πρωτεΐνη σύνδεσης του DNA, καθώς διαθέτει ένα αντίστοιχο μοτίβο έλικας - στροφής - έλικας, όπως και η TRF1, στη θέση 484 - 451. Το συνολικό μήκος της φτάνει τα 542 αμινοξέα [39]. Αντίστοιχα με την TRF1, η TRF2 σχηματίζει ομοδιμερή ή ολιγομερή μέσω της δομής διμερισμού TRFH. Η περιοχή διμερισμού της εντοπίζεται στη θέση 84 - 287, της οποίας προηγείται μία περιοχή πλούσια σε Αργινίνη και Γλυκίνη και αναφέρεται ως “GAR domain” [28, 39]. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η TRFH της TRF2 δεν αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TIN2 [38, 40] (Εικόνα 5).

Rap1

Η Rap1 δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον άνθρωπο. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι αποτελεί σημαντικό συνδέτη της πρωτεΐνης TRF2. Σε έρευνα, έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη της TRF2 είναι απαραίτητη για την προσέλευση και τη διατήρηση της σταθερότητας της Rap1 στο μόριο της σελτερίνης [41].

Τρεις βασικές δομές συγκροτούν το μόριο της πρωτεΐνης αυτής. Αρχικά, στο αμινο - τελικό της άκρο φέρει ένα BRCT μοτίβο, δηλαδή μία περιοχή που συμβάλλει στη ρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και μπορεί να αναγνωρίσει φωσφορυλιωμένα πεπτίδια (αντίστοιχη του μοτίβου που διαθέτει η πρωτεΐνη BRCA 1) [28]. Στη συνέχεια, φέρει ένα Myb μοτίβο, το οποίο συντελεί σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης με κάποιο άγνωστο μέχρι στιγμής μόριο [42]. Το καρβοξυ - τελικό της άκρο αποτελεί την περιοχή με την οποία η Rap1 αλληλεπιδρά και συνδέεται στην TRF2 πρωτεΐνη [28] (Εικόνα 5).

TIN2

Η πρωτεΐνη TIN2 χαρακτηρίζεται ως «γέφυρα» στο μόριο της σελετερίνης, καθώς συνδέει τις πρωτεΐνες TRF1, TRF2 και TPP1, επιτυγχάνοντας την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που συνδέονται στο δίκλωνο DNA με εκείνες που συνδέονται στο μονόκλωνο τμήμα του τελομερούς [43].

Στο καρβοξυ - τελικό της άκρο, η TIN2, διαθέτει ένα μοτίβο FxLxP, το οποίο αναγνωρίζεται από την TRFH περιοχή της TRF1 και αλληλεπιδρά, ενώ παράλληλα το αμινο - τελικό της άκρο αλληλεπιδρά με την TRF2 [44]. Αυτού του είδους οι συνδέσεις είναι ικανές να επιτρέψουν παροδικά την έμμεση αλληλεπίδραση των TRF1 και TRF2 [43]. Μία δεύτερη περιοχή στο αμινο - τελικό άκρο της TIN2 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της τρίτης σε σειρά πρωτεΐνης, της TPP1. Οι δύο αυτές περιοχές στο αμινο - τελικό άκρο της TIN2 είναι διακριτές στο σύμπλοκο TRF2/TIN2/TPP1, στο οποίο η TPP1 ενισχύει τη σύνδεση μεταξύ TIN2 και TRF2 [45] (Εικόνα 5).

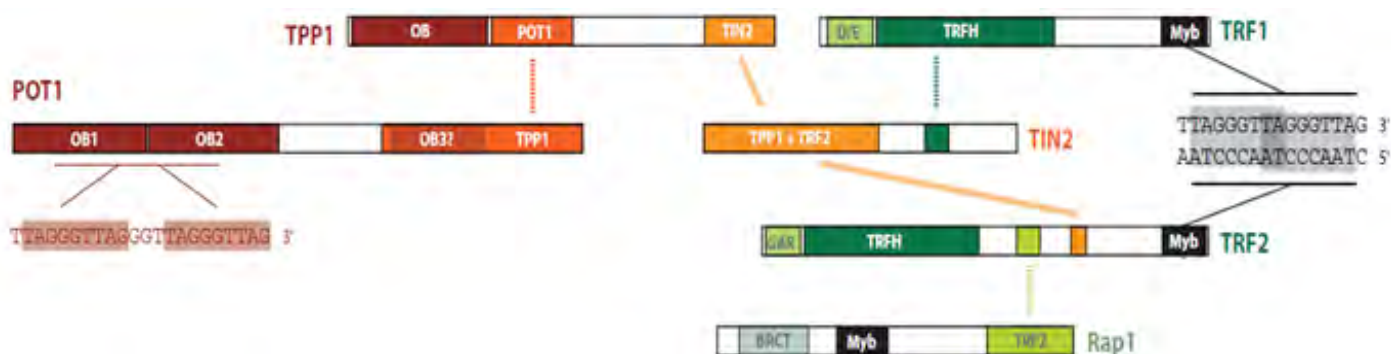
TPP1

Η TPP1 ανακαλύφθηκε λόγω της συσχέτισής της με την TIN2 [46]. Οι βασικές δομές από τις οποίες αποτελείται και χαρακτηρίζουν τη δράση της είναι οι εξής: δύο περιοχές αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TIN2 και POT1 στο καρβοξυ - τελικό και στο μέσο της πρωτεΐνης αντίστοιχα, καθώς και μία δομή “OB - fold”, όπως ονομάζεται, η οποία αλληλεπιδρά με την τελομεράση και πιστεύεται ότι καθιστά την TPP1 ρυθμιστή της [47, 48]. Μεταξύ των περιοχών αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες εντοπίζεται μια πλούσια σε σερίνη αμινοξική αλληλουχία, η δράση της οποίας παραμένει άγνωστη [43, 49] (Εικόνα 5).

POT1

Το τελευταίο πρωτεϊνικό μόριο της σελετερίνης που θα περιγραφεί είναι η POT1, η οποία αποτελεί την πιο καλά συντηρημένη πρωτεΐνη στο σύμπλοκο της σελετερίνης. Η POT1 ανακαλύφθηκε λόγω της υψηλής ομολογίας της με τις TEBP α/β (Telomeric binding complex) του *Oxytricha nova* [50].

Στο αμινο - τελικό της άκρο, η POT1 διαθέτει δύο περιοχές ανάστροφων επαναλήψεων (“OB - fold domains”), μέσω των οποίων μπορεί να αναγνωρίσει και να συνδεθεί σε μονόκλωνες συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA [51]. Με αυτό τον τρόπο λοιπόν, η POT1 είναι ικανή να συνδεθεί στη μονόκλωνη αλυσίδα - η οποία είναι πλούσια σε γουανίνη - που είχε εκτοπιστεί από την εισχώρηση του βρόγχου G κατά τη δημιουργία της θηλειάς T. Ύστερα από αναλύσεις αλληλούχησης, βρέθηκε ότι το μόριο διαθέτει μία τρίτη OB περιοχή στο καρβοξυ - τελικό της άκρο, μαζί με μία περιοχή αναγνώρισης και σύνδεσης με την TPP1 [52] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών που συγκροτούν τη σελτερίνη, καθώς και των βασικών δομών από τις οποίες αυτές αποτελούνται. [Palm W, de Lange T. *How shelterin protects mammalian telomeres*. Annu Rev Genet. 2008; 42:301–334.]

1.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

Η τελομερική βιολογία αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον με το πέρασμα του χρόνου, καθώς συνειδητοποιούμε τη σημαντικότητα των τελομερών στη «διατήρηση της ζωής» από ένα απλό κύτταρο μέχρι έναν ολοκληρωμένο πολυκύτταρο οργανισμό. Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται στοχευμένη μελέτη γύρω από τα τελομερή του ανθρώπου. Παρόλα αυτά αξίζει να τονιστεί ότι η συμβολή τους στη ζωή δεν είναι ανθρωποκεντρική.

Πρωτεύον ρόλος των τελομερών, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην αρχή της εισαγωγής, είναι η προστασία του γενωμικού DNA από εξωνουκλεάσες, μηχανισμούς επιδιόρθωσής του, ανασυνδυασμούς ή συνδέσεις μεταξύ των χρωμοσωμικών άκρων, λόγω εύρεσης ομολογίας (“end - to - end fusions”). Απουσία των τελομερών, το εκάστοτε κύτταρο θα ήταν επιρρεπές σε χρωμοσωμική ή γενωμική αστάθεια, σε γήρανση και σε απόπτωση.

1.5. ΤΕΛΟΜΕΡΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Η τελομερική δυσλειτουργία είναι μία κατάσταση στην οποία το τελομερές δεν έχει πλέον τη δυνατότητα να προστατεύει το γενωμικό DNA από απώλεια, ανασυνδυασμούς, παράγοντες καταστροφής του DNA, μηχανισμούς επιδιόρθωσης ή συνδέσεις μεταξύ μη ομόλογων άκρων [7-9]. Τόσο το μειωμένο τελομερικό μήκος -που προκύπτει μετά από κάθε κυτταρικό κύκλο, λόγω αδυναμίας επιμήκυνσης των τελομερών από κάποιο μηχανισμό-, όσο και η ανεπαρκής προστασία της τελομερικής δομής από πρωτεΐνες που συγκροτούν τη σελτερίνη, αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες τελομερικής δυσλειτουργίας [53 - 56].

1.5.1. Το τελομερές ως στόχος των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA στρατολογούνται από τους DDR παράγοντες (DNA Damage response), όταν στο DNA προκύψουν μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις, κάποιο απροστάτευτο μονόκλωνο ολιγονουκλεοτιδικό τμήμα ή μη συμπληρωματικό ταίριασμα νουκλεοτιδίων. Τα προβλήματα αυτά συμβαίνουν κυρίως κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, αλλά και σε άλλες φάσεις του κυτταρικού, όπως στην G1, G2 και G2/M [57]. Η πορεία από την αναγνώριση του σήματος κάποιας καταστροφής του DNA μέχρι την επίλυσή της, οι κύριοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο η τελομερική δυσλειτουργία μπορεί να αντιληφθεί από το κύτταρο ως DDR θα αναλυθούν στη συνέχεια.

1.5.1.1. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης στη φάση S του κυτταρικού κύκλου

Η νεοσύνθεση του DNA, δηλαδή η διαδικασία της αντιγραφής του, συχνά συνεπάγεται λάθη. Λανθασμένη τοποθέτηση νουκλεοτιδίων, ολίσθηση σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, χάσματα, κ.α. μπορούν να οδηγήσουν σε καθυστέρηση ή κατάρρευση της διχάλας αντιγραφής. Σε αυτή την περίπτωση, δημιουργούνται μονόκλωνες ή δίκλωνες ριζες στο DNA αντίστοιχα, οι οποίες στρατολογούν παράγοντες σηματοδότησης DDR [58, 59].

Αρχικά, για την επιδιόρθωση λανθασμένης τοποθέτησης νουκλεοτιδίου κατά την αντιγραφή λειτουργεί το MMR (mismatch repair) μονοπάτι, το οποίο αναγνωρίζει και αφαιρεί το ελλατωματικό νουκλεοτίδιο και στη συνέχεια καλύπτει το κενό με τη δράση κάποιας πολυμεράσης [60]. Στη συνέχεια, για μονόκλωνες εγκοπές ή χάσματα λειτουργούν δύο μηχανισμοί: η κάλυψη των κενών από πολυμεράσες TLS (translesion synthesis) ή ο μηχανισμός TS (template switch) [61, 62]. Ο κύριος όμως μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τα τελευταία στάδια της αντιγραφής είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination - HR), καθώς και οι επιμέρους παραλλαγές αυτού.

Δίκλωνες θραύσεις του DNA μπορούν, εκτός άλλων παραγόντων, να συμβούν κατά την κατάρρευση της διχάλας αντιγραφής. Σε αυτή την περίπτωση, υπό τη δράση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, που θα αναλυθεί στη συνέχεια, πυροδοτείται ο ομόλογος ανασυνδυασμός [57]. Το πρωταρχικό βήμα του μηχανισμού αυτού είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στα σπασμένα άκρα. Η αναδιαμόρφωση μπορεί να συμβεί μέσω ATP εξαρτώμενων ενζύμων ή μέσω φωσφορυλίωσης ιστονών, όπως της H2AX [63].

Στη συνέχεια, στο δίκλωνο χάσμα προσελκύεται πληθώρα συμπλόκων και άλλων πρωτεϊνών, που συνεργάζονται για την εξέλιξη της διαδικασίας. Το σύμπλοκο MRN αποτελείται από τις πρωτεΐνες Mre11, RAD50 και NBS1. Η Mre11 έχει την ικανότητα να συνδέεται στα δύο άκρα της δίκλωνης ρήξης και να αποτρέπει την απομάκρυνή τους, ενώ παράλληλα έχει δραστηριότητα έξω - και ενδονουκλεάσης 3' -> 5' σε μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA [64-66]. Η RAD50 αλληλεπιδρά με την Mre11 και λόγω της δομής της μπορεί να συνδέεται σε

δίκλωνο DNA, προκαλώντας ένα μικρό ξετύλιγμα των άκρων [67]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η RAD50 έχει αντίστοιχη δράση με την Mre11 όσον αφορά τη συγκρότηση των δύο δίκλωνων άκρων στη ρήξη σε μεγαλύτερο εύρος, όπως για παράδειγμα σε σπασμένα χρωμοσώματα [68, 69]. Το MRN σύμπλοκο συγκροτείται μέσω της δράσης της NBS1, η οποία παράλληλα στρατολογεί πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και ελέγχου των σταδίων του κυτταρικού κύκλου στα σημεία των θραύσεων [70, 71].

Άλλα μόρια όπως η CtIP (βοηθάει στη σύνδεση του MRN στο άκρο του dsDNA), η BRCA1 και η BARD1 στρατολογούνται στο σημείο αυτό, όπου το MRN πραγματοποιεί μία μικρή εκτομή 3' -> 5'. Στη συνέχεια, η EXO I ή η DNase 2 σε συνδυασμό με την BLM (ελικάση) καταλύει μία μεγαλύτερης έκτασης εκτομή βάσεων με φορά 5' -> 3', δημιουργώντας ένα μονόκλωνο 3' - άκρο [72 - 75]. Παράλληλα με την εξωνουκλεολυτική επεξεργασία του δίκλωνου DNA στο σημείο της θραύσης, η πρωτεΐνη RPA συνδέεται ισχυρά στο μονόκλωνο 3' - άκρο που δημιουργείται, με σκοπό την προστασία του [76] (Εικόνα 6A). Προκειμένου όμως να βρεθεί η ομόλογη αλληλουχία και να γίνει η εισχώρηση του μονόκλωνου άκρου στη δίκλωνη έλικα, είναι απαραίτητη η δράση μιας άλλης πρωτεΐνης, της Rad51. Η ισχυρή αλληλεπίδραση RPA - ssDNA δεν επιτρέπει τη σύνδεση της Rad51, η οποία υποβοηθάται από τη δράση του συμπλόκου BRCA1/BARD1 και BRCA2, πιθανώς μέσω σύνδεσης με την PALB2 [77, 78]. Η καθοριστική όμως σύνδεση της Rad51 στο ssDNA γίνεται μέσω της BRCA2, η οποία καταλύει τη σύνδεση της Rad51 στο 5' - άκρο του DNA. Μετά τη σύνδεσή της, η Rad51 ψάχνει ομόλογες αλληλουχίες [79-81] (Εικόνα 6B). Η εύρεση ομόλογων αλληλουχιών και η περαιτέρω συνέχιση της διαδικασίας μπορεί να ακολουθήσει 4 διαφορετικές πορείες, οι οποίες αποτελούν παραλλαγές του ίδιου μηχανισμού.

Μηχανισμός DSBR (double-strand break repair)

Στο μονοπάτι DSBR το προαναφερθέν μονόκλωνο 3' - άκρο εισχωρεί στη δίκλωνη έλικα, συνδέεται με τη συμπληρωματική αλυσίδα - εκτοπίζοντας τον κλώνο με την ομόλογη αλληλουχία - , την οποία χρησιμοποιεί ως εκμαγείο για την επιμήκυνσή του μέσω της δράση κάποιας πολυμεράσης. Αντίστοιχα, το μονόκλωνο άκρο του άλλου θραύσματος του DNA χρησιμοποιεί την εκτοπισμένη αλυσίδα, δηλαδή τη συμπληρωματική του και επιμηκώνεται με την ίδια διαδικασία. Η εισχώρηση αυτή δημιουργεί μία θηλειά D. Όσο επιμηκώνεται το 3' - άκρο, τόσο προχωράει και αυξάνεται σε μέγεθος η θηλειά D. Τη στιγμή που η θηλειά θα καλύψει το δεύτερο άκρο του θραύσματος, οι εγκοπές αποκαθίστανται, μέσω δράσης DNA λιγασών και δημιουργούνται δύο κόμβοι του Holliday (HJs - Holliday Junctions) (Εικόνα 6D). Ο τρόπος με τον οποίο η ρεσολβάση θα κόψει τους HJs, καθορίζει το αν θα προκύψουν διασκελισμοί ή όχι στα προϊόντα (Εικόνα 6E). Παρόλα αυτά, οι διασκελισμοί συμβαίνουν σπάνια στα σωματικά κύτταρα [82-84].

Μηχανισμός SDSA (synthesis-dependent strand annealing)

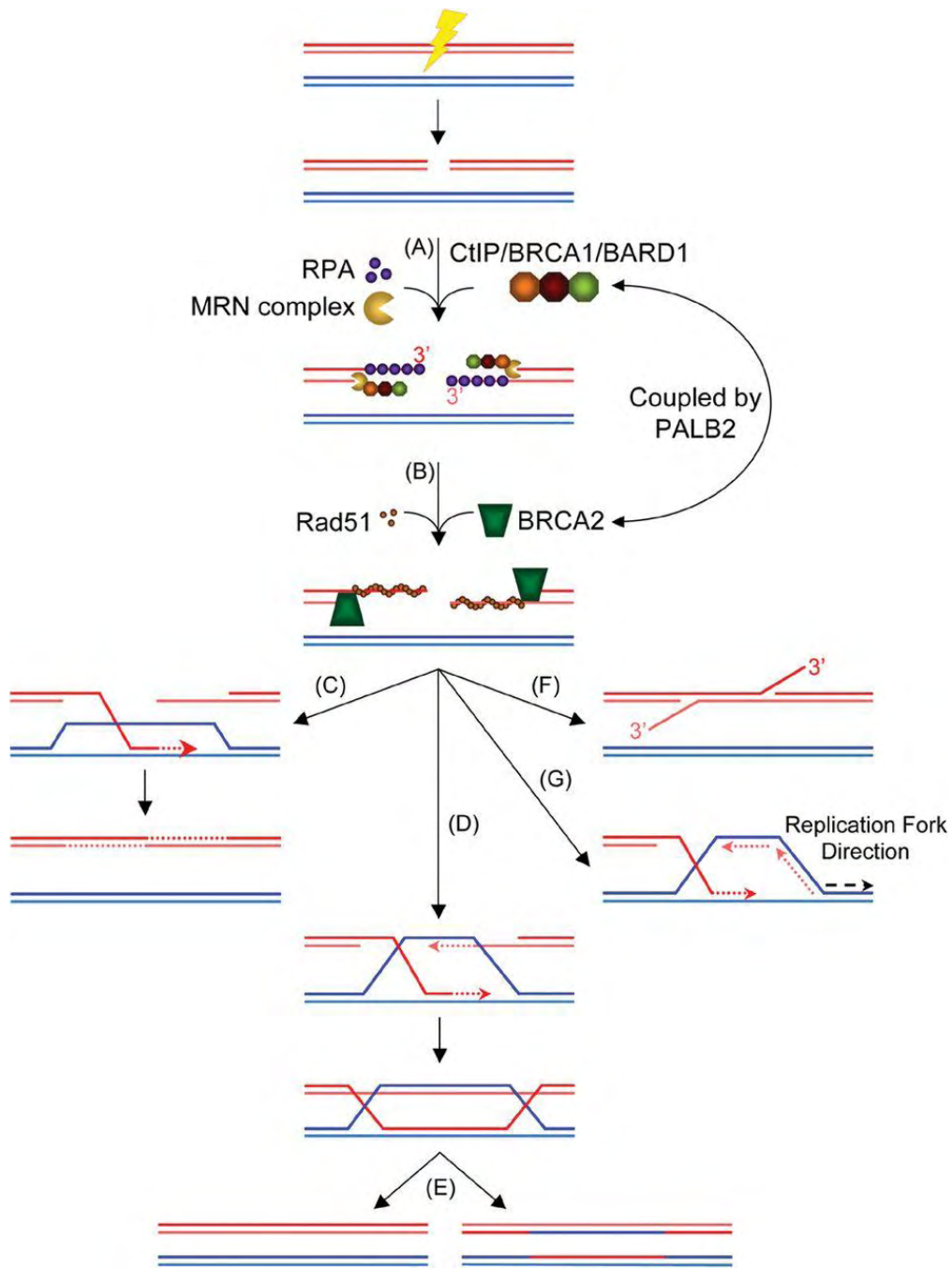
Ο μηχανισμός SDSA φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός ολοκλήρωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού. Βασική διαφορά του μηχανισμού αυτού από τον DSBR είναι ότι στον μηχανισμό SDSA δεν δημιουργούνται HJs. Το μονόκλωνο 3' - άκρο εισχωρεί και πάλι στη δίκλωνη έλικα, που η Rad51 έχει καθορίσει ως ομόλογη, αλλά εκτοπίζεται από τη θηλειά D και συνδέεται με το συμπληρωματικό 3' - άκρο του άλλου μορίου που υπέστη τη ρήξη. Στη συνέχεια, τα χάσματα συμπληρώνονται από την DNA πολυμεράση και τα κενά ενώνονται με DNA λιγάσες. Γίνεται λοιπόν εύκολα αντιληπτό ότι με αυτόν τον τρόπο δεν μπορούν να προκύψουν διασκελισμοί [85] (Εικόνα 6C).

Μηχανισμός SSA (single-strand annealing)

Ο μηχανισμός SSA ενεργοποιείται όταν εκατέρωθεν της διπλής ρήξης υπάρχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρείται εισχώρηση των μονόκλωνων 3' - άκρων, αλλά απλή σύνδεσή τους στη θέση των συμπληρωματικών πρώην επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Μετά τη σύνδεσή τους παρατηρείται εκτομή των προεξέχοντων 3' - άκρων και σύνδεση των κενών στη δίκλωνη έλικα [86] (Εικόνα 6F).

Μηχανισμός BIR (break-induced repair)

Σε μία δίκλωνη ρήξη, μπορεί να τύχει να βρεθεί ομολογία μόνο στο άκρο του ενός θραύσματος ή και στα δύο θραύσματα σε διαφορετικές όμως θέσεις. Σε αυτή την περίπτωση ενεργοποιείται ο BIR μηχανισμός. Μετά την εισχώρηση του μονόκλωνου άκρου, παρατηρείται μία κατά κάποιο τρόπο καινούργια διχάλα αντιγραφής, κατά την οποία γίνεται ενίσχυση των μονόκλωνων τμημάτων από την Pol δ - και ίσως και την ε - με συνεχή και ασυνεχή κλώνο. Οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι προκύπτουν από συντηρητικό τρόπο αντιγραφής [87] (Εικόνα 6G). Οι γνώσεις της ερευνητικής κοινότητας πάνω στο μηχανισμό αυτό είναι σε πολύ αρχικά στάδια, αλλά φαίνεται να έχει μεγάλη σημασία όχι μόνο στην επιδιόρθωση του DNA, αλλά και στη διατήρηση των τελομερών όπως θα εξηγηθεί παρακάτω, στην εισαγωγή.



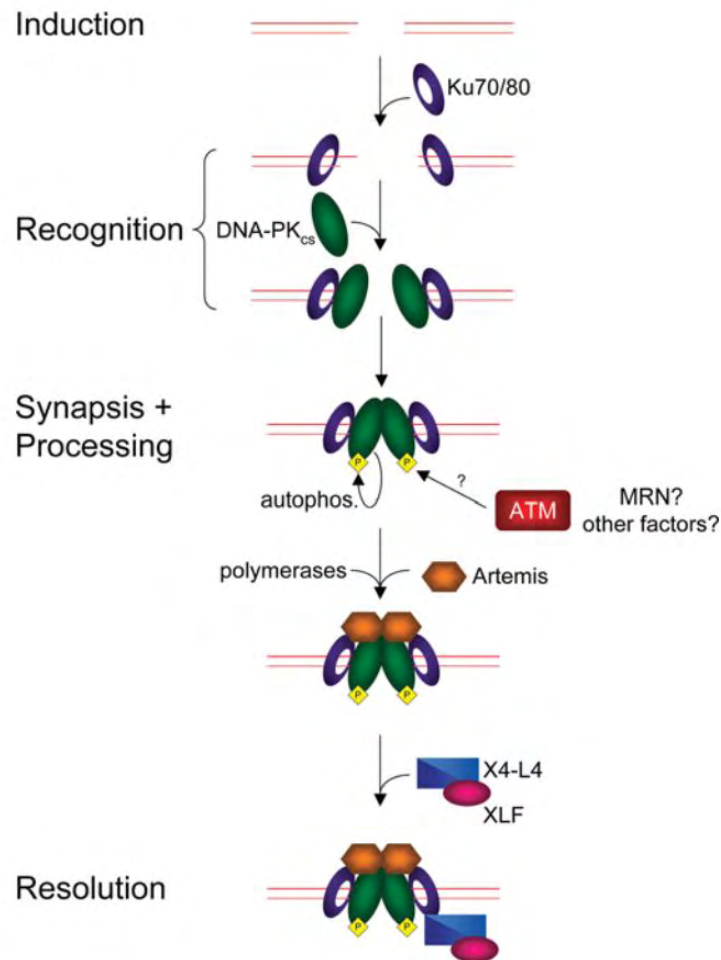
Εικόνα 6: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των βημάτων στον ομόλογο ανασυνδυασμό. (A) Εξωνουκλεολυτική επεξεργασία των δίκλωνων άκρων προς δημιουργία 3' - μονόκλωνων άκρων. Σύζευξη με RPA για προστασία. (B) Αντικατάσταση RPA από Rad51, εύρεση ομόλογης αλληλουχίας. (C) Μονοπάτι SDSA (D) Μονοπάτι DSBR (E) Προϊόντα με διασκελισμούς και μη από τη λύση των HJs. (G) Μονοπάτι BIR (F) Μονοπάτι SSA. [Hartlerode AJ., Scully R. (2009) *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. Biochem J. 423(2): 157–168.]

1.5.1.2. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης στις φάσεις G2 και G2/M του κυτταρικού κύκλου

Με το πέρας της αντιγραφής, χάσματα και δίκλωνες ρήξης στο DNA πρέπει να διορθωθούν, πριν περάσει το κύτταρο στη μίτωση. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός μπορεί να δράσει και σε αυτές τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Όμως, ένας άλλος μηχανισμός φαίνεται να προηγείται του ομόλογου ανασυνδυασμού στα τελευταία στάδια της G2 φάσης, δηλαδή στο σημείο ελέγχου G2/M, όπου ο βαθμός συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων είναι αρκετά υψηλός και συνεπώς καθίσταται δύσκολη έως και αδύνατη η έυρεση ομολογίας [88-90].

NHEJ

Ο μηχανισμός NHEJ (Non - homologous end joining) κινητοποιείται με τη σύνδεση του ετεροδιμερούς Ku70/Ku80 σε κάθε άκρο της δίκλωνης ρήξης [91]. Το ετεροδιμερές αλληλεπιδρά με την κίνηση DNA-PKcs και κινούμενο προς το άκρο της ρήξης βοηθάει στη σύνδεσή της στο DNA [92]. Η κίνηση αυτή επιτρέπει τη «γεφύρωση» μέσω των κινασών, αλλά και την ενεργοποίηση αυτών μέσω αυτοφωσφορυλίωσης [93, 94]. Κάποιες έρευνες υποθέτουν πιθανή δράση του συμπλόκου MRN και συνεπώς ενεργοποίηση της ATM σηματοδότησης στο σημείο αυτό, στηριζόμενοι στη υψηλή ικανότητα προσέγκυσης τμημάτων DNA της RAD50. Η θεωρία όμως αυτή ακόμα στηρίζεται σε ενδείξεις [75]. Στη συνέχεια, τα άκρα φωσφορυλιώνονται και επεξεργάζονται κατάλληλα από το ένζυμο Artemis - ανήκει στις μεταλο-β-λακταμάσες-, το οποίο έχει δραστηριότητα DNA-PKcs - διαμεσολαβούμενης 5' -> 3' εξωνουκλεάσης, καθώς και δραστηριότητα ενδονουκλεάσης εξαρτώμενης από DNA-PKcs. Η νουκλεολυτική επεξεργασία από το σύμπλοκο μπορεί να οδηγήσει σε κενά τα οποία καλύπτονται απο πολυμεράσες [95-97]. Τέλος, τα DNA άκρα ενώνονται ύστερα από δράση του συμπλόκου X4-L4, το οποίο αποτελείται από την DNA λιγάση IV, το XRCC4 και το XLF [98] (Εικόνα 7).

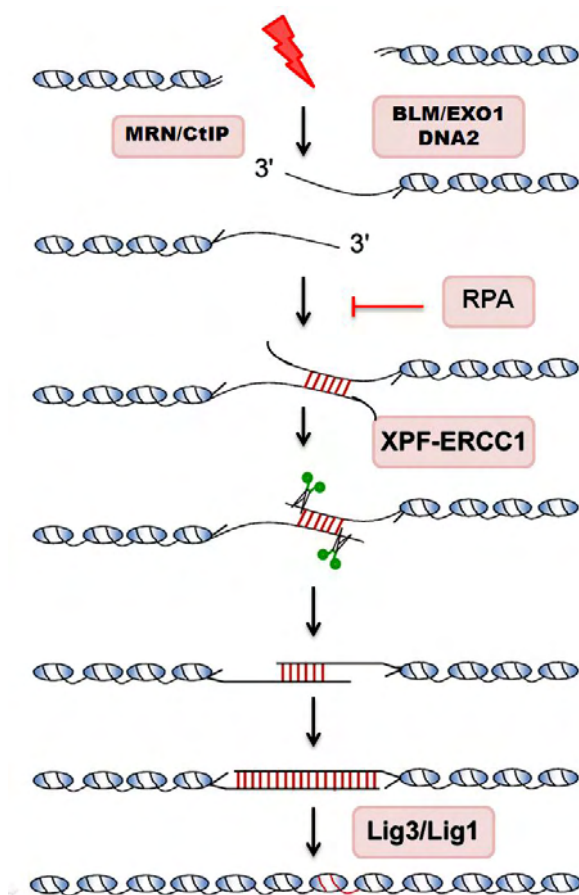


Εικόνα 7: Η διαδικασία του μηχανισμού NHEJ, όπου στο σημείο της δίκλωνης ρήξης συνδέεται το ετεροδιμερές Ku70/Ku80. [Hartlerode AJ., Scully R. (2009) *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. *Biochem J.* 423(2): 157–168.]

MMEJ

Τα τελευταία χρόνια έχει έρθει στο προσκήνιο ένας εναλλακτικός μηχανισμός NHEJ, ο οποίος ονομάστηκε MMEJ (Microhomology-mediated end joining) [75]. Ο μηχανισμός αυτός είναι επιρρεπής σε λάθη προκαλώντας χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως απαλοιφές, μετατοπίσεις αναστροφές και άλλες αναδιατάξεις που οδηγούν σε γενωμική αστάθεια [99]. Στον MMEJ επιδιορθώνονται δίκλωνες ρήξεις στο DNA, μέσω εύρεσης ολιγονουκλεοτιδικών ομόλογων αλληλουχιών (MHs - microhomologies) 2-20 bp [100-103].

Το πρώτο βήμα στον MMEJ είναι η νουκλεολυτική επεξεργασία των σπασμένων άκρων, σε έκταση τέτοια ώστε να αποκαλυφθούν οι ομόλογες αλληλουχίες. Το πρώτο βήμα καταλύεται από το MRN σε συνδυασμό με το CtIP και τη συνεργασία άλλων νουκλεασών όπως η EXO I ή η DNase 2 μαζί με την ελικάση BLM [104-107]. Στη συνέχεια, οι συμπληρωματικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες κάθε μονόκλωνου άκρου που προέκυψε συνδέονται και τα εξέχοντα άκρα καλύπτονται από την RPA, η οποία μπλοκάρει τη δράση των εξωνουκλεασών και τα προστατεύει [108, 109]. Στο σημείο αυτό, το σύμπλοκο XPF/ERCC1 κόβει τα καλυμμένα μονόκλιωνα τμήματα, αφήνοντας δύο ελεύθερα 3' - υδροξύλια σε κάθε άκρο, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ενίσχυσή τους από DNA πολυμεράσες. Ο μηχανισμός ολοκληρώνεται με τη σύνδεση των κενών από τις DNA λιγάσες 3 και 1 [110, 111] (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού MMEJ. Μετά τη δίκλωνη ρήξη, δημιουργούνται μονόκλιωνα 3' - άκρα από το MRN/CtIP και BLM/EXO I ή DNase 2. Τα μονόκλιωνα άκρα καλύπτονται

και προστατεύονται από την RPA. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται σύνδεση των συμπληρωματικών αλληλουχιών και εκτομή των προεξεχόντων άκρων. Τέλος, τα κενά συμπληρώνονται από DNA πολυμεράσες και συνδέονται από τη Lig3 και τη Lig1. [H. Wang, X. Xu, *Microhomology-mediated end joining: new players join the team*. Cell Biosci. 2017; 7: 6.]

1.5.1.3. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου

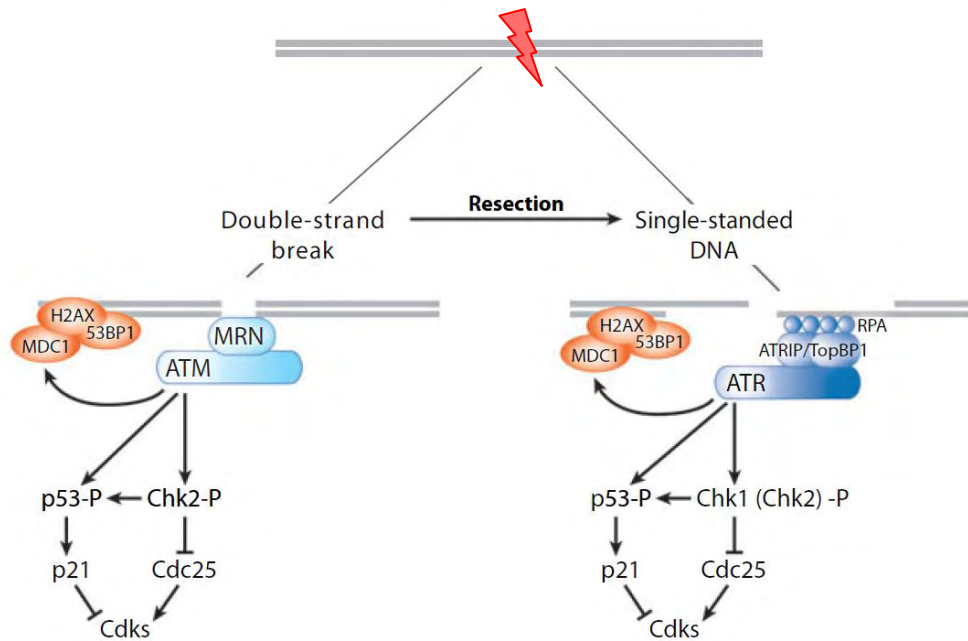
Οι βλάβες που συμβαίνουν στο DNA κατά τη διάρκεια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου οφείλονται κυρίως σε τυχαία λάθη από το ενδογενές οξειδωτικό stress, από χημικούς παράγοντες ή UV ακτινοβολία. Παρόλα αυτά, είναι πολύ σημαντικό να επιδιορθωθούν, ειδάλλως θα προκαλέσουν πολύ σοβαρά προβλήματα στη διεξαγωγή της αντιγραφής του DNA. Η απουσία αδελφών χρωματίδων καθιστά τον NHEJ, καθώς και τον MMEJ, τους κυριότερους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς στη φάση αυτή, σε αντίθεση με τον HR. Δευτερεύοντες μηχανισμοί είναι δυνατό να λειτουργήσουν, αλλά μόνο σε ειδικές περιπτώσεις βλαβών (NER όταν δημιουργούνται διμερή πυριμιδίνης) [57].

1.5.1.4. Αναγνώριση του τελομερικού άκρου ως DDR

Αρχικός στόχος της υποενότητας ήταν να εξηγηθεί ο τρόπος με τον οποίο ένα δυσλειτουργικό τελομερές αποτελεί στόχο των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Όμως, πριν καταλήξει το κύτταρο να επιδιορθώσει μια βλάβη, πρέπει πρώτα να την αντιληφθεί. Συνεπώς, ένα δυσλειτουργικό τελομερές πρέπει να λειτουργήσει ως «σήμα» βλάβης, το οποίο θα πυροδοτήσει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι με τελική κατάληξη την επιλογή κάποιου μηχανισμού επιδιόρθωσης.

Τα κύτταρα του ανθρώπου αντιλαμβάνονται μία βλάβη στο DNA μέσω δύο σηματοδοτικών μονοπατιών, στα οποία πρωταγωνιστούν οι κινάσες ATM και ATR (PI3-Ks phosphatidylinositol 3-kinases). Το ATM μονοπάτι ενεργοποιείται στις δίκλωνες ρήξεις, ενώ από το ATR μονοπάτι αναγνωρίζεται μονόκλωνο DNA είτε από μονόκλωνη ρήξη του DNA, είτε από εκτομή των άκρων μιας δίκλωνης ρήξης [112]. Τα πρωταρχικά μόρια που

ενεργοποιούν κάθε μονοπάτι είναι το MRN σύμπλοκο και η πρωτεΐνη RPA, αντίστοιχα. Η ATM αλληλεπιδρά δομικά με την NBS1 του συμπλόκου MRN, αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται, ενώ η ATR αλληλεπιδρά με την ATRIP (ATR interacting protein) που συνδέεται στην RPA, καθώς και με το σύμπλοκο Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1), τη Rad17 και την TopBP1 (DNA topoisomerase 2-binding protein 1) και τελικά ενεργοποιείται [113-115]. Οι ενεργοποιημένες πλέον κινάσες φωσφορυλιώνουν την ιστόνη H2AX στη σερίνη 139 - για αναδιαμόρφωση της χρωματίνης -, καθώς και άλλους DDR παράγοντες (MDC1, 53BP1, MRN), οι οποίοι στρατολογούνται στο σημείο της βλάβης και δημιουργούν διακριτά «συσσωματώματα», τα λεγόμενα TIFs στα τελομερή (Telomere Dysfunction-Induced Foci). Παράλληλα, φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες όπως οι BRCA1, SMC1 και ρυθμιστές κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες (Chk1, Chk2), προκειμένου να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος στο εκάστοτε σημείο ελέγχου και να γίνει σωστά η επιδιόρθωση της βλάβης. Η φωσφορυλίωση των Chk1 και Chk2 οδηγεί σε καταστολή της φωσφατάσης Cdc25, η οποία αποφωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις CDKs (cyclin-dependent kinases). Με αυτό τον τρόπο σταματάει ο κυτταρικός κύκλος στα σημεία G1/S ή G2/M. Παράλληλα, οι ATM και ATR αλληλεπιδρούν με τις Chk2 και Chk1 και φωσφορυλιώνουν την p53, η οποία σταματάει το κυτταρικό κύκλο μέσω ενεργοποίησης της p21 και περαιτέρω καταστολής των CDKs. Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί σε κυτταρική γήρανση και απόπτωση [28, 57] (Εικόνα 9). Τελικά, το κύτταρο καταφέρνει να αντληφθεί και να επιδιορθώσει τη βλάβη.

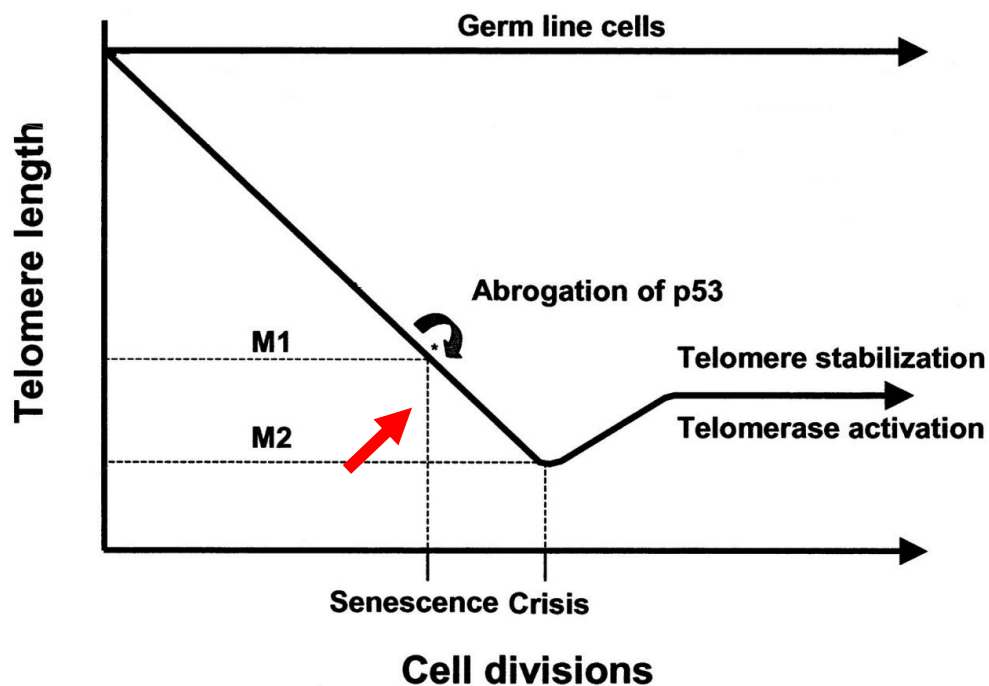


Εικόνα 9: Η πορεία από τη στιγμή της βλάβης μέχρι την επιδιόρθωσή της προϋποθέτει την ενεργοποίηση των μονοπατιών ATM/ATR. [Palm W, de Lange T. *How shelterin protects mammalian telomeres*. Annu Rev Genet. 2008; 42:301–334.]

Το ερώτημα όμως γιατί ένα δυσλειτουργικό τελομερές αποτελεί εναρκτήριο σήμα αυτών των μονοπατιών παραμένει αναπάντητο. Η απάντηση αυτή βρίσκεται στη δομή του. Ένα δυσλειτουργικό τελομερές προκύπτει είτε από μειωμένο μήκος, είτε από ελλιπή κάλυψή του από τη σελτερίνη. Και στις δύο περιπτώσεις οι πρωτεΐνες που συγκροτούν τη σελτερίνη είναι ποσοτικά λιγότερες ή εκλείπουν. Απουσία της TRF2, η οποία εμποδίζει τη σύνδεση του MRN, το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς είναι ακάλυπτο, ενώ απουσία της POT1 το μονόκλωνο τμήμα του τελομερούς είναι απροστάτευτο και η RPA είναι ελεύθερη να συνδεθεί. Παρόλο που η RPA έχει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης σε μονόκλωνο DNA από την POT1, η έλλειψη εξειδικευμένης αλληλουχίας της αυξάνει τη συγγένεια της POT1 στο τελομερές. Κατά συνέπεια, παρουσία των TRF2 και POT1 δεν μπορούν να συνδεθούν τα εναρκτήρια μόρια των προαναφερθέντων σηματοδοτικών μονοπατιών και δεν καταλήγει το κύτταρο σε ψευδές σήμα βλάβης του DNA [28].

1.5.2. Κυτταρική γήρανση

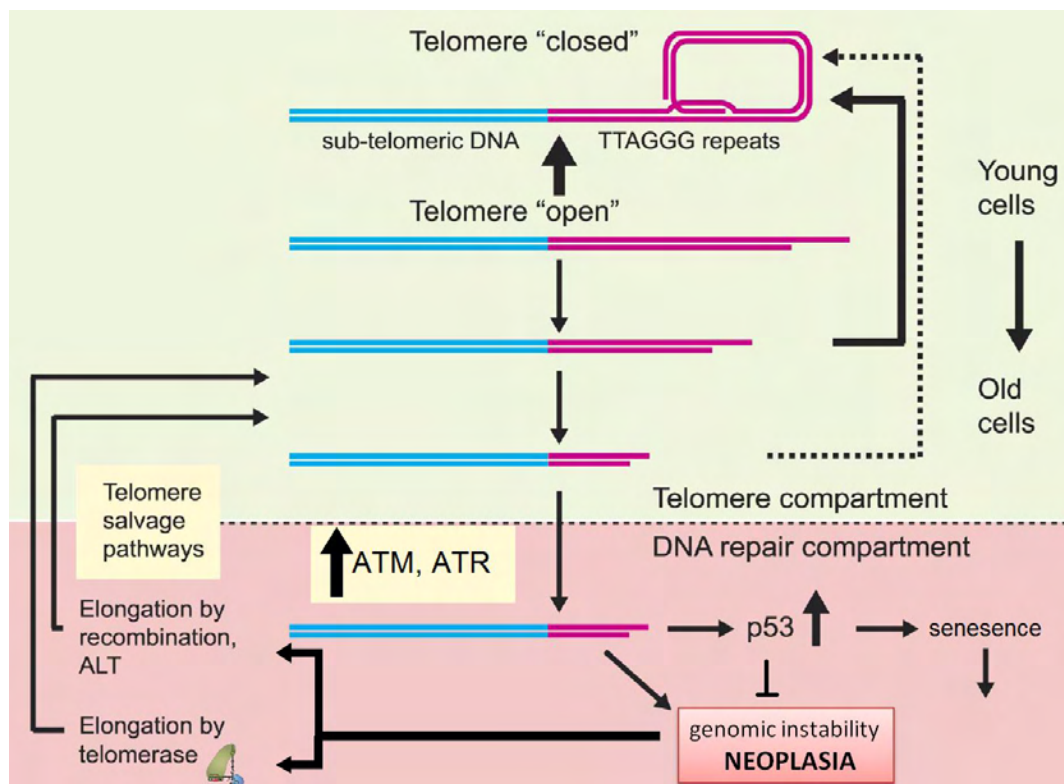
Το 1990, προτάθηκε από τους Greider και Harley ο όρος “replicative senescence”, που υποδηλώνει ότι με την πάροδο των κυτταρικών διαιρέσεων μειώνεται το τελομερικό μήκος και τα κύτταρα σταδιακά χάνουν την αντιγραφική τους ικανότητα [116]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το μήκος των τελομερών λειτουργεί ως βιολογικό ρολόι, το οποίο ρυθμίζει το χρόνο ζωής του κυττάρου, καθώς υπάρχει ένα συγκεκριμένο ελάχιστο τελομερικό μήκος (“Hayflick limit”) [117-119]. Στο σημείο αυτό σταματάει ο κυτταρικός κύκλος και το κύτταρο εισέρχεται στη φάση της αντιγραφικής γήρανσης (M1 - mortality stage 1) [120-122]. Τα κύτταρα τα οποία ξεπερνούν το σημείο αυτό, απενεργοποιώντας την p53, συνεχίζουν να διαιρούνται και φτάνουν στο σημείο M2, δηλαδή σε μία πολύ κρίσιμη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο - πολύ μικρά και δυσλειτουργικά τελομερή- [123-125]. Παρόλα αυτά, κάποια κύτταρα καταφέρνουν και ενεργοποιούν μηχανισμούς επιμήκυνσης των τελομερών τους, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν της κρίσης και να αθανατοποιούνται [126] (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Στο διάγραμμα φαίνεται η πορεία του τελομερικού μήκους με την πάροδο των κυτταρικών διαιρέσεων. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το “Hayflick limit”. [Yu-Sheng Cong, Woodring E. Wright, and Jerry W. Shay (2002) *Human Telomerase and Its Regulation*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3): 407–425.]

1.5.3. Καρκίνος

Το κρίσιμο σημείο ελέγχου ενός κυττάρου για το αν θα μετατραπεί σε καρκινικό ή όχι ελέγχεται από ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το p53. Ήδη, έχει τονιστεί ότι ένα δυσλειτουργικό τελομερές προκαλεί γενωμική αστάθεια. Στο σημείο αυτό δρα η p53, η οποία σταματάει τον κυτταρικό κύκλο και οδηγεί σε απόπτωση του κυττάρου. Αν για οποιοδήποτε λόγο δεν ενεργοποιηθεί ή κατασταλεί η δράση της p53, η γενωμική αστάθεια οδηγεί σε νεοπλασία. Ένα νεοπλασματικό κύτταρο όμως θα πέθαινε, αν δεν μπορούσε να διατηρήσει το τελομερικό του μήκος. Για το λόγο αυτό, τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς, με τους οποίους αρχικά αυξάνουν και στη συνέχεια διατηρούν το τελομερικό τους μήκος. Η πλειοψηφία των νεοπλασιών (~ 85%) στηρίζεται στη δράση της τελομεράσης, ενώ υπάρχει και ένας εναλλακτικός μηχανισμός επιδιόρθωσης (ALT - Alternative Lengthening of Telomeres) που αφορά ένα μικρότερο, αλλά σημαντικό, ποσοστό νεοπλασιών [127] (Εικόνα 11).



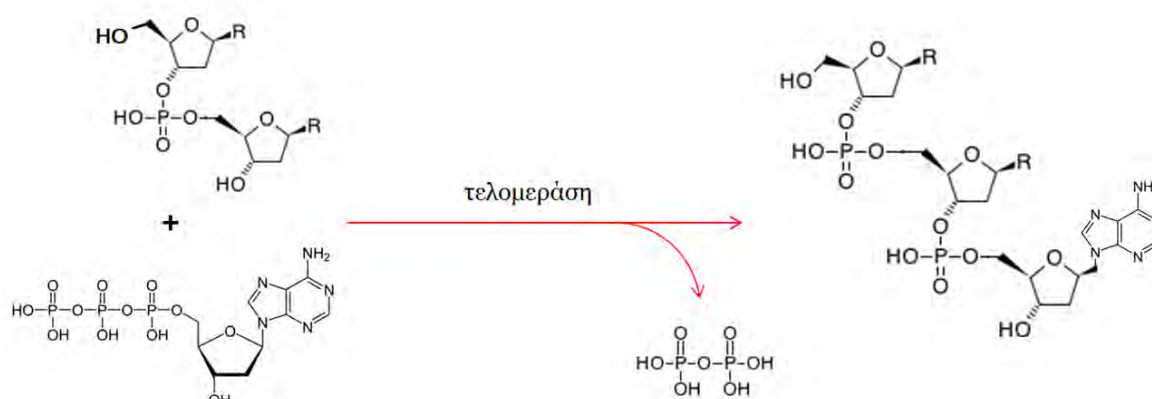
Εικόνα 11: Η πορεία προς τη νεοπλασία καθορίζεται από την τελομερική ακεραιότητα και τη δράση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. [Shay JW, *Telomeres and aging*. Curr Opin Cell Biol. 2018 Jun;52:1-7.]

1.6. ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

1.6.1. Τελομεράση

Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο που ανακαλύφθηκε από τους E. Blackburn και C. Greider, το 1987. Οι ερευνητές αποκάλυψαν ότι ο “G - rich” βρόγχος του τελομερούς έχει την ικανότητα νεοσύνθεσης από μία RNA - διαμεσολαβούμενη DNA πολυμεράση [128, 129]. Η τελομεράση ανήκει στις τρανσφεράσες και είναι ικανή να συνδέεται στο τελομερικό άκρο και να το επιμηκύνει προσθέτοντας διαδοχικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής (Εικόνα 12):

2'-δεοξυριβονουκλεοσίδιο 5'-τριφωσφορικό + DNA (n) \rightleftharpoons διφωσφορικό + DNA (n+1)



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης που καταλύει η τελομεράση. [https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?reaction+R00379]

Το μόριο της τελομεράσης αποτελείται από δύο πολύ σημαντικά συστατικά, τα οποία καθορίζουν τη λειτουργία του. Το πρώτο είναι μία ριβονουκλεοπρωτεϊνική αλληλουχία - hTERC ή hTR όπως ονομάζεται στον άνθρωπο -, η οποία λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση του τελομερικού DNA [130, 131]. Η ύπαρξη αυτής της συγκεκριμένης αλληλουχίας στο μόριο της τελομεράσης αποτελεί το στοιχείο που τη διαχωρίζει από τις υπόλοιπες RNA - διαμεσολαβούμενες DNA πολυμεράσες. Η τελομεράση διαθέτει επίσης

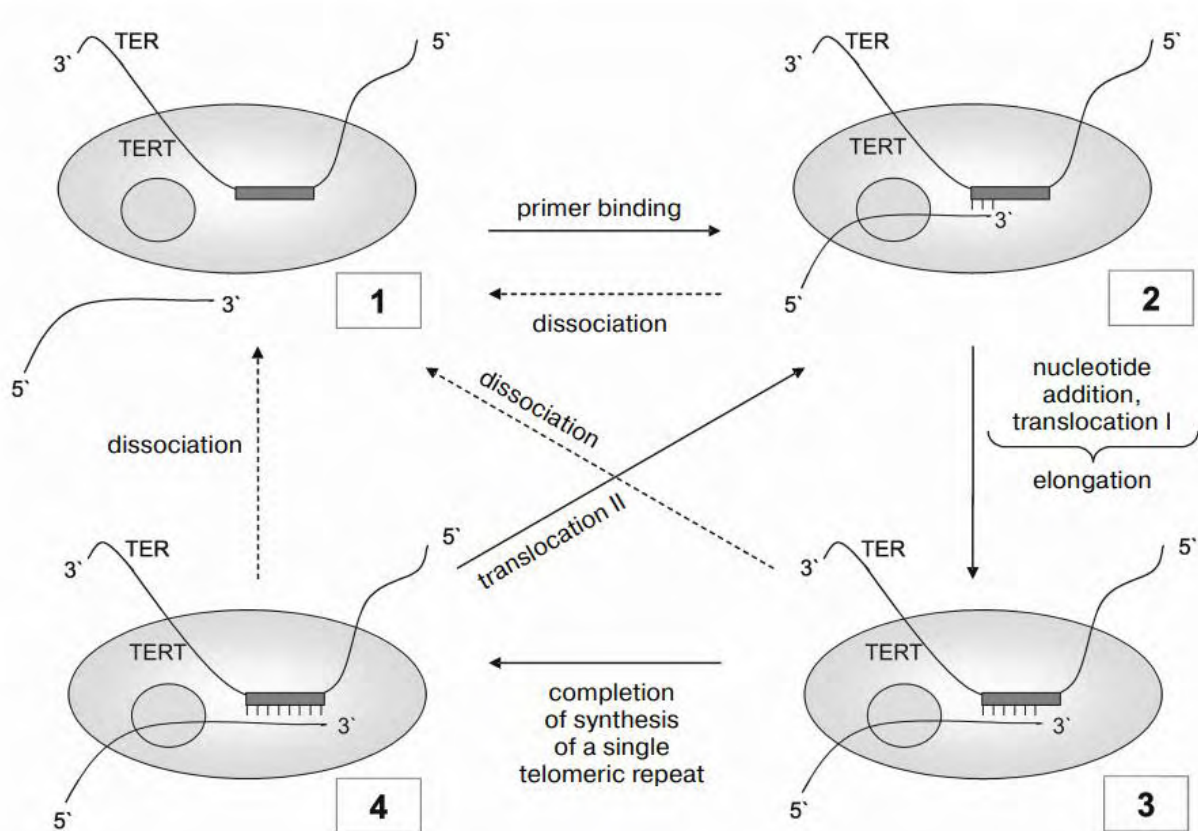
μία καταλυτική υπομονάδα δράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (hTERT), μέσω της οποίας προσθέτει τα συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια στο τελομερικό άκρο, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προαναφερθείσα δομή, δηλαδή την RNA αλληλουχία 3'- CCCAAUCCC - 5' [132]. Τέλος, το μόριο της τελομεράσης στους ανθρώπους, καθώς και σε άλλους οργανισμούς, διαθέτει μία επιπλέον διακριτή περιοχή, η οποία ονομάζεται “TEN domain” και αποτελεί το αμινο - τελικό άκρο της hTERT. Η δομή αυτή διαθέτει μία περιοχή σύνδεσης σε μονόκλωνο DNA που ονομάζεται “anchor site”. Μέσω της anchor site πραγματοποιείται ισχυρότερη σύνδεση του μορίου της τελομεράσης στο μονόκλωνο άκρο του τελομερούς, γεγονός που ενισχύει την εξέλιξη και ολοκλήρωση της διαδικασίας της επιμήκυνσης [133, 134]. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι η τελομεράση στους άνθρωπο μπορεί να λειτουργήσει εξίσου αποτελεσματικά και χωρίς τη μεσολάβηση της TEN, όπως επίσης ότι η TEN πιθανώς να έχει και μια ικανότητα σύνδεσης στο 5' - άκρο του RNA, το οποίο παρεμποδίζει μερικώς τη σύνδεση της hTERT στο DNA [135, 136].

1.6.1.1. Μηχανισμός δράσης της τελομεράσης

Η λειτουργία της τελομεράσης είναι να επιμηκύνει το τελομερικό άκρο. Ο μηχανισμός όμως, με τον οποίο δρα στον εκάστοτε οργανισμό, εξαρτάται από το ίδιο το μόριό της. Συνεπώς, ο μηχανισμός εμφανίζει μικρές αλλά διακριτές διαφορές ανά οργανισμό. Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 13) παρουσιάζεται μια συνολική σχεδιαγραμματική απεικόνιση των βημάτων που εν δυνάμει θα ακολουθήσει μία τελομεράση. Η σειρά, η εναλλαγή και ο αριθμός των βημάτων εξαρτάται από το ένζυμο του προς μελέτη οργανισμού. Ο μηχανισμός της ανθρώπινης τελομεράσης αποτελείται από τα εξής βήματα: (1) αναγνώριση και σύνδεση του αρχικού τμήματος, (2) επιμήκυνση - ενίσχυση του τελομερικού άκρου, (3) μετατόπιση της τελομεράσης (translocation II) και (4) απελευθέρωση του τελομερούς.

Πιο αναλυτικά, η ριβονουκλεοτιδική αλληλουχία hTERC αναγνωρίζει και συνδέεται με μία ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία (3 νουκλεοτίδια) στο τέλος

του τελομερικού 3' - άκρου, που ονομάζεται αρχικό τμήμα. Ακολούθως, ξεκινάει το δεύτερο βήμα που είναι η επιμήκυνση του τελομερικού άκρου. Η τελομεράση προσθέτει ένα - ένα τα νουκλεοτίδια σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, μέσω της καταλυτικής υπομονάδας της hTERT, που έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης. Τη στιγμή που θα ολοκληρωθεί η αντιγραφή του RNA εκμαγείου που διαθέτει, το υβριδικό μόρια DNA - RNA αποκολλάτε από την hTERT, χωρίς όμως να απελευθερώνεται από το ένζυμο. Σε αυτό το σημείο έγκειται η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των τελομερασών των διαφόρων οργανισμών, δηλαδή στον τρόπο με τον οποίο η hTERT θα συνεχίσει τη δράση της όταν θα έχει ολοκληρώσει την αντιγραφή του hTERC. Η τελομεράση καλείται να μετατοπιστεί και μέχρι στιγμής υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους το καταφέρνει. Στον άνθρωπο, η μετατόπιση τύπου II που συμβαίνει, αποτελεί ξεχωριστό βήμα από την ενίσχυση του τελομερούς, ενώ σε άλλους οργανισμούς ενίσχυση και μετατόπιση (τύπου I) πραγματοποιούνται παράλληλα. Συνεπώς, μετά την αποκόλληση του DNA - RNA συμπλόκου, το τελομερές δεν απελευθερώνεται πλήρως, αλλά η hTERC είναι ελεύθερη να αναγνωρίσει εκ νέου μία ολιγονουκλεοτιδική συμπληρωματική αλληλουχία και να συνδεθεί, ακολουθώντας ξανά την ίδια διαδικασία επιμήκυνσης. Όταν η hTERT ολοκληρώσει τη διαδικασία της επιμήκυνσης, απελευθερώνει το νεοσυντιθέμενο μονόκλωνο άκρο του τελομερούς. Τέλος, το μονόκλωνο τμήμα του τελομερούς αντιγράφεται με τη δράση DNA πολυμερασών και έτσι ολοκληρώνεται η διαδικασία επιμήκυνσής του [135 - 138].



Εικόνα 13: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των διαφορετικών τελομερασών. Στον άνθρωπο, τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής: (1) - (2) - (3) - (4) - (2) - (3) - (4) και τέλος (1) με τον τρόπο που περιγράφηκαν προηγουμένως. [Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. (2010) *Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation*. *Biochemistry (Mosc)*. 75(13):1563-83.]

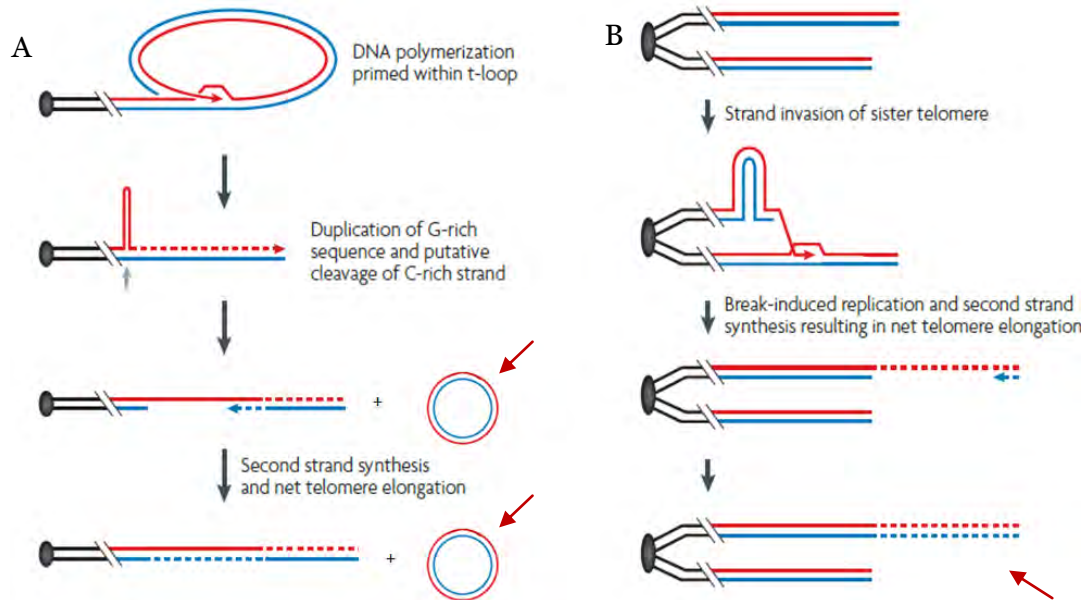
1.6.2.Εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών

Πριν το 1993, επικρατούσε η αντίληψη ότι ο μοναδικός τρόπος επιμήκυνσης των τελομερών ήταν με τη δράση της τελομεράσης. Η E. Blackburn αρχικά και ο R. Reddel στη συνέχεια, ανέτρεψαν αυτή την πεποίθηση [139, 140]. Η ομάδα του R. Reddel αποκάλυψε για πρώτη φορά ότι υπάρχουν ανθρώπινα κύτταρα, καρκινικά και αθάνατα σωματικά, τα οποία δεν εκφράζουν τελομεράση, αλλά κινητοποιούν ένα εναλλακτικό μονοπάτι επιμήκυνσης των τελομερών τους (ALT pathway – Alternative Lengthening of Telomeres pathway) [140].

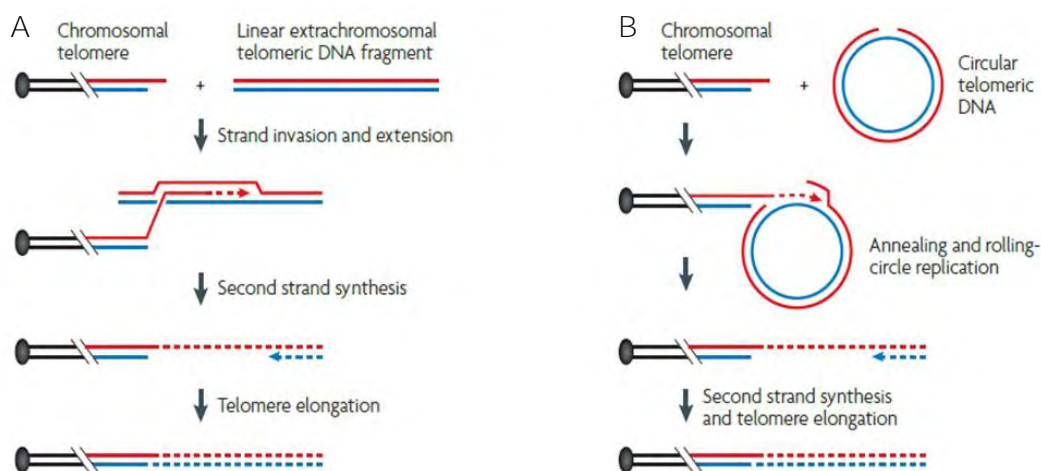
Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν εξειδικευμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, αλλά παράλληλα διατηρούν την ίδια τελομερική δομή. Κύριο φαινοτυπικό γνώρισμα των ALT κυττάρων είναι το εξωχρωμοσωμικό τελομερικό DNA που διαθέτουν. Αυτό μπορεί να είναι σε μορφή κυκλικών δίκλωνων μορίων DNA (t - circles), μερικώς μονόκλωνων κυκλικών μορίων DNA πλούσιων σε κυτοσίνες (C - circles), γραμμικών δίκλωνων μορίων ή συμπλόκων με υψηλό μοριακό βάρος (“t - complex”) [141-144]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι τελομερικές αλληλουχίες (εξω- και ενδοχρωμοσωμικές) στα ALT κύτταρα και οι πρωτεΐνες της σελετερίνης (π.χ. TRF2) αλληλεπιδρούν με DDR πρωτεΐνες (π.χ. Rad51, RPA, 53BP1, MRN), καθώς και με την πρωτεΐνη PML (Promyelocytic Leukemia body protein) προς σχηματισμό των APBs (ALT - associated PML bodies) [145]. Τα APBs φαίνεται να συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό των τελομερικών άκρων συνδέοντας τα τελομερικά άκρα και ενισχύοντας τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις [146]. Τέλος, τα ALT κύτταρα χαρακτηρίζονται από ραγδαίες αυξομειώσεις στα τελομερικά μήκη και πολύ υψηλά ποσοστά ανασυνδυασμού στα τελομερή [147-149].

Ο ALT μηχανισμός σχετίζεται άμεσα με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, καθώς για να πραγματοποιηθεί η επιμήκυνση του τελομερούς, απαιτείται η σύνδεση του μονόκλωνου 3' - τελομερικού άκρου σε μία συμπληρωματική αλληλουχία. Συνεπώς, ο ALT μηχανισμός χρησιμοποιεί τόσο τον ομόλογο ανασυνδυασμό, όσο και τον BIR [150]. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να τονιστεί ότι έχει βρεθεί κατασταλτική δράση του MMEJ έναντι του ALT και μείωση του τελομερικού μήκους [151]. Στον HR - διαμεσολαβούμενο ALT μηχανισμό, η τελομερική επιμήκυνση προϋποθέτει την ενίσχυση του 3' - βρόγχου, ο οποίος έχει εισχωρήσει στην θηλειά T (εικόνα 14 A), στην αδελφή χρωματίδα (εικόνα 14 B), στη δίκλωνη έλικα ενός άλλου τελομερούς ή εξωχρωμοσωμικού τελομερούς (εικόνα 15 A) ή σε t- ή C- circle (εικόνα 15 B) [150, 152]. Αν ο 3' - βρόγχος ενός τελομερούς χρησιμοποιήσει την θηλειά T του ή την αδελφή χρωματίδα του χρωμοσώματός του, τότε δημιουργούνται C - circles και T-SCEs (telomeric sister chromatid exchanges) αντίστοιχα. Ο φαινότυπος αυτός είναι χαρακτηριστικός για τη δράση του κλασσικού HR - διαμεσολαβούμενου ALT μηχανισμού. Αντίθετα, στον BIR - διαμεσολαβούμενο ALT μηχανισμό αυξάνονται μόνο τα T-SCEs, καθώς οι

συμπληρωματικές αλληλουχίες προέρχονται μόνο από αδελφές χρωματίδες ή το τελομερικό άκρο κάποιου άλλου χρωμοσώματος [150].



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του ALT μηχανισμού. (Α) Εύρεση συμπληρωματικής αλληλουχίας μέσω της θηλειάς T, ενίσχυση του τελομερικού άκρου και δημιουργία C - circle. (Β) Εύρεση συμπληρωματικής αλληλουχίας μέσω της αδελφής χρωματίδας και δημιουργία T-SCE. Τα κόκκινα βέλη υποδηλώνουν τα C - circles και T-SCEs στα Α και Β αντίστοιχα. [Cesare AJ, Reddel RR. (2010) *Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications*. Nat Rev Genet. 11(5):319-30.]



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του ALT μηχανισμού. (Α) Εύρεση συμπληρωματικής αλληλουχίας από άλλο χρωμόσωμα ή από εξωχρωμοσωμική τελομερική αλληλουχία. (Β) Εύρεση συμπληρωματικής

αλληλουχίας από t- ή C - circle. [Cesare AJ, Reddel RR. (2010) *Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications*. Nat Rev Genet. 11(5):319-30.]

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

Μελέτες έχουν δείξει ότι η MRE11 εμφανίζει in vitro μια ασθενή ενδο- και εξωνουκλεολυτική δραστηριότητα, η οποία μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη βοηθητικών παραγόντων, καθώς και ότι η CtIP αυξάνει την ενδονουκλεολυτική δραστηριότητά της [153, 154 - 156, 157]. Επίσης, είναι γνωστό ότι η MRE11 μπορεί να κόβει το DNA σε απόσταση ως και 300 βάσεις από τη δίκλωνη ρήξη [158, 159] και ότι με αναστολή της ενδονουκλεολυτικής δραστηριότητάς μειώνεται το εύρος εκτομής του 5' - άκρου συγκριτικά με την αντίστοιχη αναστολή της εξωνουκλεολυτικής δράσης της. Από τα στοιχεία αυτά προκύπτει ότι ικανότητά της αυτή διευκολύνει την πρόσβαση άλλων εξωνουκλεασών, οι οποίες αρχίζουν την εκτομή του άκρου στη δίκλωνη ρήξη [160].

Σε μία προσπάθεια να μελετήσουν άλλες πρωτεΐνες που λειτουργούν ως συμπαραγόντες του συμπλόκου MRN, η ομάδα του Δρ. Wojciech Niedzwiedz ανακάλυψε την EXD2 (Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2). Η EXD2 αποτελεί ένα ελλειπώς χαρακτηρισμένο μόριο. Το 2016 αποδείχθηκε ότι έχει δράση εξωνουκλεάσης και λειτουργεί ως συμπαραγόντας της CtIP στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η EXD2 φέρει μία καταλυτική υπομονάδα εξωνουκλεάσης, αντίστοιχη με αυτή της WRN (Werner syndrome protein) και απέδειξαν ότι λειτουργεί ως εξωνουκλεάση 3' -> 5'. Επίσης, απέδειξαν ότι η εξωνουκλεάση EXD2 λειτουργεί συνεργατικά με την MRE11 στο σύμπλοκο MRN για την εκτομή των δίκλωνων ρήξεων του DNA. Παρόλα αυτά, η EXD2 δεν μπορεί να εκκινήσει τη διαδικασία της εκτομής, καθώς λειτουργεί καθοδικά της MRE11.

Τέλος, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η EXD2 εκτός από λειτουργικό κατέχει και ένα ρυθμιστικό ρόλο, καθώς -πέραν της δράσης της ως εξωνουκλεάση- φαίνεται να ρυθμίζει και τη δράση της MRE11 στο σύμπλοκο MRN [161].

II. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η συγκεκριμένη εργασία είχε ως στόχο τη διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας των τελομερών στην νεοπλασία. Σε ένα ALT νεοπλασματικό κύτταρο μπορεί να διαφοροποιείται τόσο η δομή, όσο και η λειτουργία των τελομερών του. Παράγοντες που επηρεάζουν αυτές τις αλλαγές είναι κυρίως μόρια που συμμετέχουν στον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η πιθανή δράση της εξωνουκλεάσης EXD2 στον ALT μηχανισμό.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ❖ Πλήρες θρεπτικό υλικό: Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1X (DMEM) (Gibco), βόειο εμβρυϊκό ορό 10% (Fetal Bovine Serum - FBS) (Gibco), πενικιλίνη 10 mg/mL (Sigma Aldrich) και στρεπτομυκίνη 10 mg/mL (Invitrogen)
- ❖ PBS 1X: PBS 10X (Gibco) αραιωμένο σε ddH₂O
- ❖ Τρυψίνη 1X: Τρυψίνη 10X (Gibco) αραιωμένη σε PBS 1X
- ❖ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide - DMSO) (Sigma Aldrich)
- ❖ Geneticin G418 (αντιβιοτικό επιλογής) 50 mg/mL (Gibco)

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι κλώνοι της κυτταρικής σειράς U2OS. Τα U2OS είναι επιθυλιακά κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- ❖ κύτταρα U2OS αγρίου τύπου

- ❖ κύτταρα U2OS GFP EXD2, τα οποία έχουν μετασηματιστεί με σκοπό να υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-EXD2
- ❖ κύτταρα U2OS GFP, τα οποία εκφράζουν την ενδογενή EXD2, αλλά έχουν μετασηματιστεί ώστε να εκφράζουν μόνο την πρωτεΐνη GFP
- ❖ κύτταρα U2OS EXD2 KO, τα οποία με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δεν εκφράζουν καθόλου την εξωνουκλεάση EXD2

Οι κλώνοι των κυττάρων που προαναφέρθηκαν αποτελούν ευγενική χορηγία και παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του καθηγητή Δρ. Wojciech Niedzwiedz (Institute of Cancer Research, London).

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε DMEM θρεπτικό υλικό, εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS (ορός αίματος βόειου εμβρύου), καθώς και 1% πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης για την προστασία των καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες. Σε συγκεκριμένους κλώνους αυτής της κυτταρικής σειράς (U2OS GFP, U2OS GFP EXD2) απαιτείται χορήγηση επιπλέον αντιβιοτικού 0,1% (v/v) Geneticin G418. Το σύνολο των διαδικασιών παρασκευής αναλώσιμων για τις κυτταροκαλλιέργειες και ο χειρισμός αυτών πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, εντός θαλάμου νηματικής ροής. Οι κυτταροκαλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ειδικό κλίβανο επώασης (Forma), Steri-Cycle-CO₂ με φίλτρο HEPA Class 100, στον οποίο διατηρείται σταθερή θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα με 5% (v/v) CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα κάθε 48 - 72 ώρες. Η παρατήρηση της μορφολογίας και της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιείται σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

1.1. ΑΠΟΨΥΞΗ ΠΑΓΩΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ειδικούς καταψύκτες σε θερμοκρασία -80°C. Τα φιαλίδια (cryo-vials), που περιέχουν τα κατεψυγμένα κύτταρα, αφήνονται στον εργαστηριακό πάγκο να ξεπαγώσουν σταδιακά ή τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για περίπου 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, το περιεχόμενό τους μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου Falcon με DMEM, αναδεύονται ελαφρά και φυγοκεντρώνται στις 1000rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο, που προέκυψε από τη

φυγοκέντρηση, απορρίπτεται, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με PBS 1X και φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως. Η διαδικασία της πλύσης με PBS1X πραγματοποιείται 2 φορές, καθώς αποσκοπεί στην πλήρη απομάκρυνση του DMSO (κρυοπροστατευτική ουσία), το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε DMEM και τοποθετείται σε φλάσκα, ο τελικός όγκος της οποίας φτάνει τα 5 mL.

1.2. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη είναι επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία προσκολλώνται στον πυθμένα των φλασκών (adherent cells) και σχηματίζουν μονοστιβάδα. Εφόσον αναπτυχθούν τόσο, ώστε να καλύψουν το 85 - 95% του εμβαδού της επιφάνειας της φλάσκας, δημιουργούν συσσωματώματα. Προκειμένου να αποφευχθεί το φαινόμενο αυτό, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Στη διαδικασία αυτή απορρίπτεται το υπερκείμενο της φλάσκας και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με PBS 1X. Στη συνέχεια, στη φλάσκα προστίθεται τρυψίνη 1X. Τα κύτταρα επώζονται με την τρυψίνη για 3 - 4 λεπτά στους 37°C. Η τρυψίνη βοηθάει στην αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας, καθώς πέπτει παροδικά τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων. Ακολούθως, προστίθεται μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού, για την αδρανοποίηση της τρυψίνης, το διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου Falcon και φυγοκεντρείται στις 1100rpm για περίπου 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε DMEM. Μικρή ποσότητα του διαλύματος που προέκυψε μεταφέρεται στη φλάσκα, όπου προστίθεται DMEM μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 5mL. Η ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος που θα μεταφερθεί στη φλάσκα εξαρτάται από την προτιμώμενη περιεκτικότητα σε κύτταρα της ανακαλλιέργειας και καθορίζεται από τον χειριστή, σύμφωνα με τις εκάστοτε ανάγκες του πειράματος. Τέλος, στην ανακαλλιέργεια προστίθενται τυχόν επιπλέον αντιβιοτικά ή φάρμακα που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των κυττάρων ή την διεκπεραίωση κάποιου πειράματος.

1.3. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ / ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Το πάγωμα των κυττάρων είναι μία απαραίτητη διαδικασία για την αποθήκευση των κυτταρικών σειρών για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι ίδια με αυτά της ανακαλλιέργειας των κυττάρων μέχρι το σημείο της επαναδιαλυτοποίησης με DMEM. Στο πάγωμα, αντί για θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με ένα μέσο το οποίο αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO ή 95% DMEM και 5% DMSO. Μετά την επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με το διάλυμα παγώματος, μεταφέρεται περίπου 1,5 mL διαλύματος σε 3 ή 4 cryo-vials. Τα cryo-vials μεταφέρονται σε ειδικούς καταψύκτες στους -80°C, όπου αποθηκεύονται.

2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΕΤΑΦΑΣΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ❖ N-διακετυλ-N-μεθυλ-κολχικίνη (Colcemid) 10 µg/mL (Gibco)
- ❖ Μονιμοποιητικό διάλυμα 3:1 Μεθανόλη (AppliChem) / Οξικό οξύ (Sigma Aldrich)
- ❖ Υποτονικό διάλυμα KCl 0,075M (Carlo Erba)

Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατή η λήψη μεταφασικών χρωμωσωμάτων και η μονιμοποίηση αυτών σε αντικειμενοφόρους πλάκες για περαιτέρω επεξεργασία. Αρχικά, τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 1 ώρα με 10 µL/mL N-διακετυλ-N-μεθυλ-κολχικίνη (Colcemid), ένα παράγωγο της κολχικίνης, το οποίο διακόπτει τον πολυμερισμό των μικροσωλινίσκων της μιτωτικής ατράκτου στο στάδιο της μετάφασης. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το υπερκείμενο της φλάσκας σε σωλήνες τύπου Falcon, ξεπλένουμε τη φλάσκα με PBS 1X, το οποίο μεταφέρεται επίσης στο ίδιο Falcon, και προσθέτουμε τρυψίνη, όπως στην ανακαλλιέργεια. Ο λόγος που δεν απορρίπτουμε τα υπερκείμενα είναι η διαφύλαξη των μιτώσεων. Ένα μιτωτικό κύτταρο δεν είναι τόσο καλά προσκολλημένο στον πυθμένα της φλάσκας, συνεπώς είναι πολύ πιθανό να αποκολληθεί από την πλύση, να παρασυρθεί και να απορριφθεί. Μετά την επώαση με τρυψίνη, προσθέτουμε μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού (περίπου 3 mL) στη φλάσκα, αναδεύουμε ελαφρά και μεταφέρουμε όλο το περιεχόμενο της φλάσκας στο προαναφερθέν falcon. Στο

σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι χρειάζεται μεγάλη προσοχή στη μεταφορά των διαλυμάτων από τη φλάσκα στο falcon που της αντιστοιχεί, προκειμένου να μην αναμειχθούν διάφοροι κλώνοι U2OS. Τα falcon φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 1200rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα ίζηματα επαναδιαλυτοποιούνται με τη μικρή ποσότητα υπερκείμενου που παρέμεινε στο falcon, ενώ στη συνέχεια προστίθενται στάγδην 5 mL υποτονικού διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση. Τα κύτταρα επώάζονται με το υποτονικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά ακριβώς. Στη διάρκεια των 20 λεπτών απελευθερώνονται τα χρωμοσώματα από τους πυρήνες των κυττάρων, λόγω του φαινομένου της ώσμωσης. Μετά το πέρας των 20 λεπτών προσθέτουμε 1 mL μονιμοποιητικού διαλύματος, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε, όπως προηγουμένως. Ακολούθως, απορρίπτουμε σχεδόν ολόκληρο το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα με το υπόλοιπο, προσθέτουμε ξανά μονιμοποιητικό διάλυμα, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται 3 φορές. Στην πρώτη προσθήκη μονιμοποιητικού διαλύματος χρησιμοποιούμε 5 mL αυτού, ενώ στις επόμενες δύο προσθέτουμε 3 mL μονιμοποιητικού. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, απορρίπτουμε ποσότητα του υπερκείμενου. Το υπερκείμενο που θα παραμείνει στο Falcon καθορίζεται από τον εκάστοτε χειριστή, ανάλογα με το εκάστοτε ίζημα. Τέλος, τα κυτταρικά διαλύματα επιστρώνονται σε υάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες φυλάσσονται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για κάποια πειραματική διαδικασία. Στην περίπτωση που το κυτταρικό εναιώρημα δεν χρησιμοποιηθεί πλήρως, μπορεί να φυγοκεντρηθεί ξανά και να αποθηκευτεί στους 4°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

3. ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ (IF - ImmunoFluorescence)

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ❖ Triton X-100 0,2%: Triton X-100 100% αραιωμένο σε PBS 1X (Applichem)
- ❖ BSA 1%: BSA 100% αραιωμένο σε PBS 1X (Promega)
- ❖ Μεθανόλη (Applichem)

- ❖ Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85% και 95% (AppliChem)
- ❖ PBS 1X (Gibco)
- ❖ Διάλυμα DAPI & Vectashield 0,1 µg/mL (Vector)
- ❖ Πρωτογενή αντισώματα:
 - ◆ anti-GFP 1:100 (χορηγία από το εργαστήριο του Δρ. Wojciech Niedzwiedz)
 - ◆ anti-TRF2 μονοκλωνικό αντίσωμα 1:500 (SCBT)
 - ◆ anti-RPA1 μονοκλωνικό αντίσωμα 1:40 (Calbiochem)
 - ◆ anti-PML μονοκλωνικό αντίσωμα 1:100 (SCBT)
 - ◆ anti-EXD2 μονοκλωνικό αντίσωμα 1:40 (χορηγία από το εργαστήριο του Δρ. Wojciech Niedzwiedz)
- ❖ Δευτερογενή αντισώματα:
 - ◆ anti-mouse (Alexa Fluor 568) 1:500 (Invitrogen)
 - ◆ anti-mouse (Alexa Fluor 488) 1:500 (Invitrogen)
 - ◆ anti-rabbit (Alexa Fluor 568) 1:500 (Invitrogen)
 - ◆ anti-rabbit (Alexa Fluor 647) 1:500

Υάλινες καλυπτρίδες ψεκάζονται με αιθανόλη και εκτίθενται σε ακτινοβολία UV για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, επιστρώνονται με κύτταρα U2OS και καλλιεργούνται για περίπου 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM). Όταν η περιεκτικότητα της καλυπτρίδας σε κύτταρα είναι 85 - 95%, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με PBS 1X για περίπου 5 λεπτά η κάθε μία. Το PBS αφαιρείται με υάλινη πιπέτα Pasteur και τα κύτταρα μονιμοποιούνται με παγωμένη μεθανόλη. Τα κύτταρα επωάζονται με την μεθανόλη στους -20°C για 10 λεπτά. Τέλος, αφαιρείται η μεθανόλη και πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS 1X σε κίνηση. Οι επιστρωμένες με κύτταρα καλυπτρίδες μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C σε PBS 1X και να χρησιμοποιηθούν εντός δύο εβδομάδων.

Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων και την έκλυση της μεθανόλης με PBS 1X, προστίθεται διάλυμα Triton X-100 0,2% και τα κύτταρα επωάζονται για ακριβώς 15 λεπτά στους 4°C. Το Triton X-100 είναι απορρυπαντικό και ανοίγει οπές στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με PBS 1X για 5 λεπτά η κάθε μία. Αφού αφαιρεθεί το PBS, τα κύτταρα επωάζονται με BSA 1% για 1 ώρα σε

θερμοκρασία. Το BSA είναι ένα διάλυμα κάλυψης αντιγονικών θέσεων και βοηθάει στην ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο με BSA 1%. Η επώαση αυτή πραγματοποιείται σε κουτί με υγρασία, στους 4°C για 2 ώρες. Για τον εντοπισμό των σημείων πρόσδεσης των πρωτογενών αντισωμάτων χρησιμοποιούνται δευτερογενή αντισώματα με φθοροχρώματα, τα οποία αραιώθηκαν με BSA 1%. Μετά το πέρας των 2 ωρών, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1X για 5 λεπτά 2 - 3 φορές και στη συνέχεια επωάζονται με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος. Η επώαση αυτή πραγματοποιείται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και καθόλου φωτός. Τα κύτταρα ξεπλένονται ξανά με PBS 1X, όπως και προηγουμένως. Στο σημείο αυτό μπορούν να ακολουθηθούν δύο διαδικασίες. Στην απλή ανοσοκυτταροχημεία, οι καλυπτρίδες αφήνονται να στεγνώσουν. Σε μία υάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 2μL DAPI για κάθε καλυπτρίδα και οι στεγνές πλέον καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάποδα στις αντικειμενοφόρους πλάκες (στο σημείο που βρίσκεται το DAPI) και αποθηκεύονται στους 4°C. Σε μία παραλλαγή της μεθόδου όμως, τα κύτταρα υφίστανται μία δεύτερη μονιμοποίηση με παγωμένη μεθανόλη (επώαση 10 λεπτά στους -20°C) μετά τις πλύσεις με PBS. Η δεύτερη μονιμοποίηση γίνεται με σκοπό να ακολουθηθεί μία δεύτερη πειραματική διαδικασία, η οποία αφορά την ανίχνευση αλληλουχιών τελομεριδιακού DNA. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται *in situ* υβριδοποίηση φθοριζόντων ανιχνευτών με τις τελομερικές αλληλουχίες και ονομάζεται PNA-FISH.

4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΑ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ (FISH - Fluorescence In Situ Hybridization)

4.1. ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (PNA-FISH)

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ❖ TBS 1X: TBS 10X αραιωμένο σε ddH₂O (Gibco)
- ❖ Φορμαλδεΰδη 3,7%: Φορμαλδεΰδη 100% (Carlo Erba) αραιωμένη σε TBS 1X

- ❖ Διάλυμα προεργασίας: HCl 10mM (Sigma Aldrich), πεψίνη 0,02% (Appllichem)
- ❖ Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10mM pH=7,4, φορμαμίδιο 70% (Appllichem)
- ❖ Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 100%
- ❖ PBS 1X
- ❖ Διάλυμα πλύσης: Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,15M (Carlo Erba), Tween 20 0,08% (Sigma Aldrich) σε pH=7,4
- ❖ Διάλυμα DAPI & Vectashield 0,1 μg/mL (Vector)
- ❖ Ανιχνευτές (probes):
 - ◆ SpO (seq TTAGGG) 0,07μL / 10μL τελικού όγκου
 - ◆ FITC (seq CCCTAA) 0,16μL / 10μL τελικού όγκου

Με την τεχνική του τελομεριδιακού PNA - FISH μπορούμε να εντοπίσουμε τις τελομεριδιακές αλληλουχίες, να μετρήσουμε το μήκος των τελομερών, καθώς και να διαπιστώσουμε τυχόν δυσλειτουργικά τελομερή, όπως για παράδειγμα εύθραυστα τελομερή. Το PNA - FISH χρησιμοποιείται κυρίως σε μεταφασικά χρωμοσώματα. Στη μελέτη αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό τελομεριδιακών αλληλουχιών σε κύτταρα που είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε ανοσοκυτταροχημεία. Τα πρωτόκολλα διαφέρουν σε πολύ λίγα σημεία, γι' αυτό θα αναλυθεί η διαδικασία που αφορά στα μεταφασικά χρωμοσώματα και θα σημειωθούν οι εκάστοτε διαφοροποιήσεις.

Αρχικά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται σε κυβέτες με TBS 1X δύο φορές για 5 λεπτά. Στην περίπτωση των καλυπτρίδων, αφαιρείται το PBS και γίνονται οι ίδιες πλύσεις με το TBS 1X. Στη συνέχεια, τα πλακάκια εμβαπτίζονται στο διάλυμα προεργασίας και επωάζονται στους 37°C για 10 λεπτά. Όταν δουλεύουμε με καλυπτρίδες δεν προσθέτουμε πεψίνη και απλά επωάζουμε τα κύτταρα με HCl 10mM για 1 λεπτό. Μετά το πέρας των 10 λεπτών ξεπλένουμε τα πλακάκια ή τις καλυπτρίδες δύο φορές με TBS 1X για 5 λεπτά. Ακολούθως, προσθέτουμε διαδοχικά παγωμένες αιθανόλες 70%, 85% και 100% για 2 λεπτά την κάθε μία και αφήνουμε τα πλακάκια ή τις καλυπτρίδες να στεγνώσουν. Αφού στεγνώσουν, επωάζουμε με τον ανιχνευτή, που είναι αραιωμένος στο διάλυμα υβριδισμού για 5 λεπτά, στους 80°C, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη των κλώνων. Μετά την

αποδιάταξη, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ή οι καλυπτρίδες επωάζονται με τον ανιχνευτή για 1 ώρα, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και σε υγρασία 95%. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μία πλύση με PBS 1X για 5 λεπτά και μία πλύση με το διάλυμα έκπλυσης στους 65°C για 5 λεπτά. Ακολούθως, γίνονται άλλες δύο πλύσεις με PBS 1X για 10 λεπτά η κάθε μία. Αφού αφαιρεθεί το PBS, προστίθεται παγωμένη αιθανόλη διαδοχικά, όπως και προηγουμένως και τα πλακάκια ή οι καλυπτρίδες αφήνονται να στεγνώσουν. Τέλος, προστίθεται διάλυμα DAPI και τα δείγματα είναι έτοιμα για παρατήρηση και καταγραφή.

4.2. ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΣΕ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ND - FISH)

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ❖ SSC 2X: SSC 20X αραιωμένο σε ddH₂O (Gibco)
- ❖ RNase A 10 mg/mL (Amresco) σε SSC 2X
- ❖ Διάλυμα προεργασίας: HCl 10mM (Sigma Aldrich), πεψίνη 0,02% (Applichem)
- ❖ Διάλυμα υβριδισμού: SSC 2X
- ❖ Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 100%
- ❖ PBS 1X
- ❖ Διάλυμα πλύσης: SSC 4X, Tween 20 0,2% (Sigma Aldrich) σε pH=7,4
- ❖ Διάλυμα DAPI & Vectashield 0,1 µg/mL (Vector)
- ❖ Ανιχνευτές (probes):
 - ◆ SpO (seq CCCTAA) 0,08µL / 10µL τελικού όγκου

Με τη συγκεκριμένη τεχνική καθίσταται δυνατό να ανιχνευθούν μονόκλωνες αλληλουχίες τελομεριδιακού DNA. Από την πειραματική διαδικασία έχει αφαιρεθεί οποιαδήποτε συνθήκη ή ουσία που μπορεί να προκαλέσει αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA και να επιφέρει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Τα επιστρωμένα στις αντικειμενοφόρες πλάκες κύτταρα ενυδατώνονται με PBS 1X και επωάζονται με διάλυμα RNase A διαλυμένη σε SSC 2X για μία ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια, ξεπλένονται δύο φορές με SSC 2X για 5 λεπτά και επωάζονται με το διάλυμα προεργασίας για 10 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αφυδατώνονται με τη διαδοχική επώασή τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις παγωμένης αιθανόλης, όπως και προηγουμένως. Ο ανιχνευτής αναμιγνύεται με το διάλυμα υβριδισμού και επωάζεται για 5 λεπτά στους 75°C. Μετά τα 5 λεπτά ο ανιχνευτής τοποθετείται κατευθείαν σε πάγο, ενώ στη συνέχεια προστίθεται στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα επωάζονται με τον ανιχνευτή για 2 ώρες, στους 37°C. Μετά τον υβριδισμό, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται μία φορά στο διάλυμα πλύσης για 15 λεπτά και τρεις φορές σε PBS 1X για 15 λεπτά. Τέλος, αφυδατώνονται, αφύνονται να στεγνώσουν και βάφονται με DAPI.

4.3. ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΥ (CO - FISH)

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ❖ BrdU/C (3:1) 1x10⁻⁵M (Sigma Aldrich)
- ❖ RNase A 10 mg/mL (Amresco) σε SSC 2X
- ❖ Hoechst 0,5 ug/mL (χορηγία από το εργαστήριο του Δρ. Wojciech Niedzwiedz)
- ❖ PBS 1X
- ❖ Εξωνουκλεάση EXOIII 100 ug/mL (NEB)
- ❖ Διάλυμα υβριδισμού: Tris-HCl 10mM pH=7,4, φορμαμίδιο 70% (Appllichem)
- ❖ Διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 100%
- ❖ PBS 1X
- ❖ Διάλυμα πλύσης I: Φορμαμίδιο 70%, BSA 0,1%, ddH₂O, Tris-HCl 1M pH=7,4
- ❖ Διάλυμα πλύσης II: Tween 20, NaCl 5M (Carlo Erba), ddH₂O, Tris-HCl 1M pH=7,4

- ❖ Διάλυμα DAPI & Vectashield 0,1 μg/mL (Vector)
- ❖ Ανιχνευτές (probes):
 - ◆ SpO (seq TTAGGG) 0,08μL / 10μL τελικού όγκου
 - ◆ FITC (seq CCCTAA) 0,16μL / 10μL τελικού όγκου

Η μέθοδος CO-FISH (Chromosome Orientation - FISH) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ανασυνδυασμών που πραγματοποιούνται στο τελομερικό μέρος μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (T-SCEs: Telomeric-Sister Chromatin Exchanges). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον κατακερματισμό των νεοσυντιθέμενων κλώνων των τελομερών και τον υβριδισμό των θυγατρικών κλώνων με ειδικούς ανιχνευτές.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε διαφορετικούς κλώνους U2OS κυττάρων. Ο κάθε κλώνος επώαστηκε με 10μL/mL του διαλύματος BrdU/C για 18 ώρες. Προκειμένου να έχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα, τα κύτταρα πρέπει να ενσωματώσουν την ουσία αυτή στο γενετικό τους υλικό κατά την αντιγραφή και να γίνει η συλλογή τους πριν προχωρήσουν σε δεύτερη κυτταρική διαίρεση. Τα χρωμοσώματα των κυττάρων που δεν έχουν ολοκληρώσει την αντιγραφή τους ή έχουν προχωρήσει σε ένα δεύτερο κύκλο αντιγραφής, κατά την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο, εμφανίζουν ζωνώσεις, σε αντίθεση με εκείνα που έχουν ενσωματώσει επιτυχώς τη BrdU/C, ενώ παράλληλα υβριδίζονται και οι δύο ανιχνευτές, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται κίτρινο χρώμα.

Μετά τη συλλογή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ενυδατώνονται σε PBS 1X για 5 λεπτά και στη συνέχεια επωάζονται με διάλυμα RNase A (100 μg/mL) σε SSC 2X για 1 ώρα στους 37°C. Έπειτα, οι πλάκες εμβαπτίζονται σε διάλυμα Hoechst για 20 λεπτά, απουσία φωτός και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα εκτίθενται σε ακτινοβολία UV (Stratalinker 1800 UV irradiator) (0,180J, 365nm) για 45 λεπτά. Η Hoechst αλληλεπιδρά με τα μόρια βρωμοουριδίνης και βρωμοκυτοσίνης, που έχουν ενσωματωθεί στο νεοσυντιθέμενο κλώνο, και με την επίδραση της ακτινοβολίας UV δημιουργούνται μονόκλωνα χάσματα. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες επωάζονται με διάλυμα εξωνουκλεάσης EXOIII για 15 λεπτά στους 37°C, η οποία δρα με κατεύθυνση 5' -> 3'. Η δράση της EXOIII έχει ως

αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Στη συνέχεια, τα πλακάκια αφυδατώνονται με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε αιθανόλη αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 85%, 100%) για 2 λεπτά στην κάθε μία. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν. Αφού στεγνώσουν, οι αντικειμενοφόρες πλάκες επωάζονται με τα διαλύματα των ανιχνευτών διαδοχικά και η κάθε επώαση διαρκεί 1 ώρα. Το πρώτο διάλυμα περιέχει τον ανιχνευτή με αλληλουχία TTAGGG (SpO) και το διάλυμα υβριδοποίησης και αντίστοιχα το δεύτερο περιέχει αυτόν με αλληλουχία CCCTAA (FITC) με το διάλυμα υβριδοποιήσεων. Σημαντικό είναι οι επωάσεις να πραγματοποιηθούν σε σκοτεινό περιβάλλον με 95% υγρασία και θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, μεταξύ των δύο επωάσεων, πραγματοποιείται μία πλύση των αντικειμενοφόρων πλακών με το διάλυμα πλύσης I για 1 λεπτό. Μετά το πέρας των επωάσεων ακολουθούν εκπλύσεις των αντικειμενοφόρων πλακών, οι οποίες πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός. Αρχικά, χρησιμοποιείται δύο φορές το διάλυμα πλύσης I για 15 λεπτά και ακολουθεί το διάλυμα πλύσεις II, το οποίο χρησιμοποιείται 3 φορές για 10 λεπτά. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλένονται 3 φορές με PBS 1X για 10 λεπτά. Μετά τις πλύσεις, τα πλακάκια αφυδατώνονται με αιθανόλη αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 95%, 100%) για 2 λεπτά η κάθε μία και αφήνονται να στεγνώσουν. Τελικά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες βάφονται με DAPI και μπορούν να παρατηρηθούν ή να αποθηκευτούν στους 4°C.

5. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία απαιτήθηκε η χρήση των ακόλουθων μικροσκοπίων:

- ❖ Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (Zeiss) για την παρατήρηση των καλλιεργούμενων κυττάρων,
- ❖ Ορθό μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss) για την παρατήρηση και φωτογράφιση των παρασκευασμάτων των διάφορων τεχνικών FISH
- ❖ Μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (Zeiss) για την παρατήρηση μεταφασικών πυρήνων και χρωμοσωμάτων.

Η επεξεργασία των φωτογραφιών που προέκυψαν από τις διάφορες τεχνικές (FISH / IF) πραγματοποιήθηκε με το ειδικό πρόγραμμα ανάλυσης φθορισμού (ISIS) της εταιρίας MetaSystems. Επίσης, για τη λήψη των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε φακός μεγέθυνσης 63X και κεδρέλαιο.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

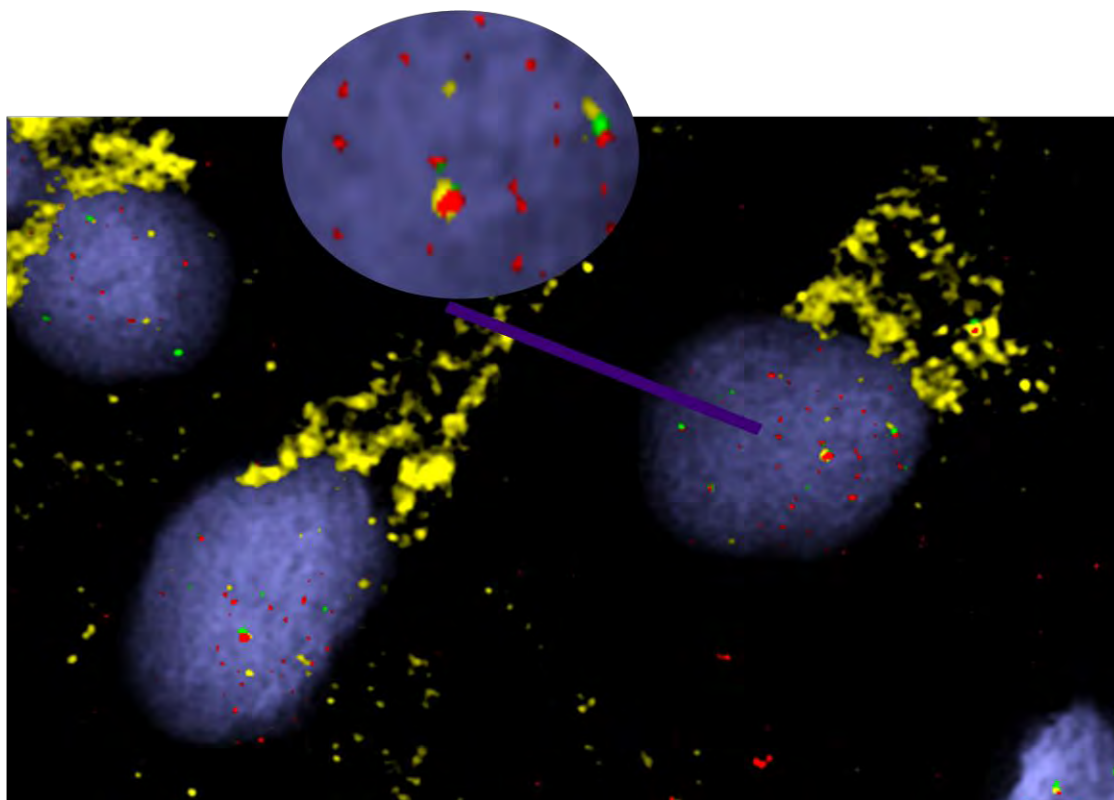
1. Η ΕΞΩΝΟΥΚΛΕΑΣΗ EXD2 ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΠΥΡΗΝΕΣ ΤΩΝ U2OS ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ

Η συγκεκριμένη εργασία ξεκίνησε με σκοπό τη μελέτη της πιθανής δράσης της EXD2 στη δομή ή/και στη λειτουργία των τελομερών. Από τη βιβλιογραφία, μας γνωστοποιείται ο ρόλος της ως εξωνουκλεάση στο γενωμικό υλικό γενικότερα, όμως δεν υπάρχει κάποια παραπομπή που να αφορά κάποια δράση της στα τελομερή. Συνεπώς, η έρευνα αυτή ξεκίνησε με το ερώτημα αν η EXD2 εντοπίζεται στα τελομερή, για να μπορεί να δρα σε αυτά. Σε μία προσπάθεια να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έγιναν διάφορα πειράματα ανοσοκυτταροχημείας (IF: ImmunoFluorescence), καθώς και πειράματα ανοσοκυτταροχημείας με PNA-FISH σε κύτταρα U2OS GFP και U2OS GFP EXD2.

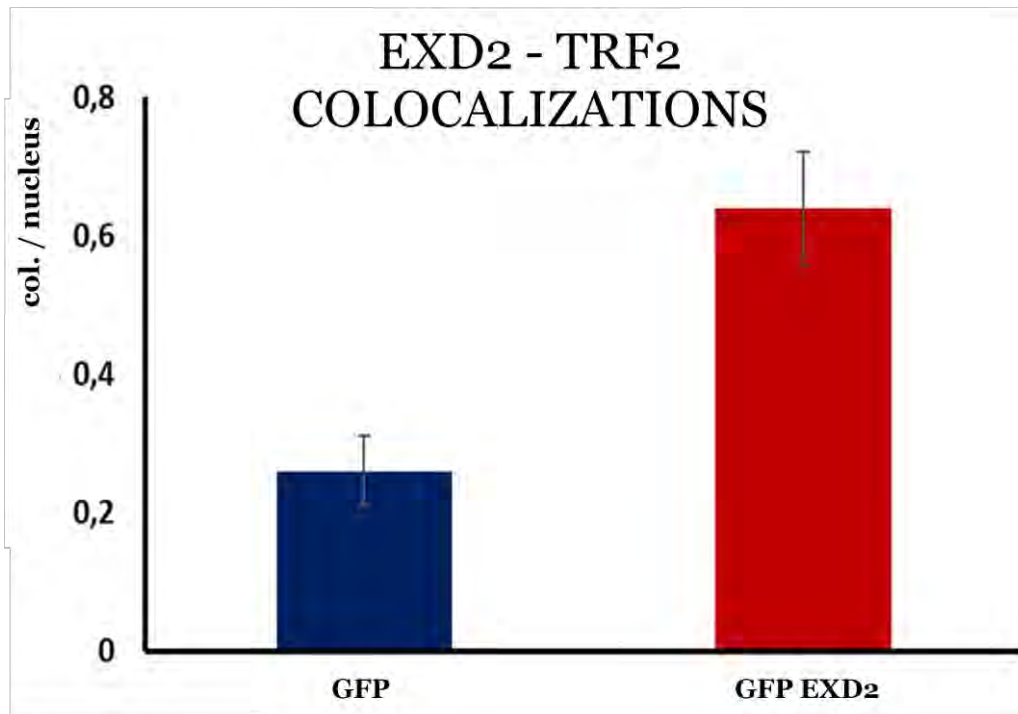
Το πρώτο πείραμα, που πραγματοποιήθηκε, ήταν μία ανοσοκυτταροχημεία για την πρωτεΐνη TRF2 με ένα PNA-FISH για τις τελομερικές αλληλουχίες. Για την πρωτεΐνη TRF2 χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό TRF2 αντίσωμα (rabbit) , το οποίο σημάνθηκε με ένα δευτερογενές anti-rabbit (Alexa Fluor 647) αντίσωμα. Στο PNA-FISH πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής με αλληλουχία TTAGGG (SpO). Η πρωτεΐνη EXD2 που εκφράζεται φθορίζει λόγω του ότι είναι συζευγμένη με την GFP (FITC). Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος ήταν ποιοτικά, αλλά φάνηκε αυξημένος συνεντοπισμός της EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 και τα τελομερή στα κύτταρα U2OS GFP EXD2, συγκριτικά με τα κύτταρα U2OS GFP που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρα (Εικόνα 16). Το δεύτερο πείραμα αφορούσε το συνεντοπισμό της

EXD2 με την TRF2. Για την υλοποίηση του χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα TRF2 και GFP, τα οποία σημάνθηκαν με τα δευτερογενή anti-rabbit (Alexa Fluor 568) και anti-mouse (Alexa Fluor 488) αντίστοιχα. Στο πείραμα αυτό μετρήθηκαν οι συνεντοπισμοί της πρωτεΐνης EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 σε 100 πυρήνες. Στο διάγραμμα της εικόνας 17 φαίνεται ότι στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2 (U2OS GFP EXD2) οι συνεντοπισμοί της με την TRF2 ανά πυρήνα αυξάνονται, συγκριτικά με τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο την ενδογενή EXD2 (U2OS GFP).

Συνεπώς, διαπιστώνεται ότι η EXD2 εντοπίζεται στα τελομερή των χρωμοσωμάτων και μπορεί εν δυνάμει να έχει κάποια δράση εκεί.



Εικόνα 16: Συνεντοπισμός της EXD2 με την πρωτεΐνη TRF2 και τα τελομερή. Η χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-EXD2 (πράσινο) σχηματίζει πυρηνικές εστίες (foci), οι οποίες συνεντοπίζονται με τα τελομερή (κόκκινο) και την πρωτεΐνη TRF2 (κίτρινο).



Εικόνα 17: Συνεντόπιση της πρωτεΐνης EXD2 με την TRF2 στα U2OS GFP EXD2 (κόκκινη στήλη) κύτταρα, συγκριτικά με τα U2OS GFP (μπλε στήλη). Για το πείραμα μετρήθηκαν 100 πυρήνες από τον κάθε κλώνο. Στο διάγραμμα φαίνεται ο μέσος όρος των συνεντοπισμών ανά πυρήνα.

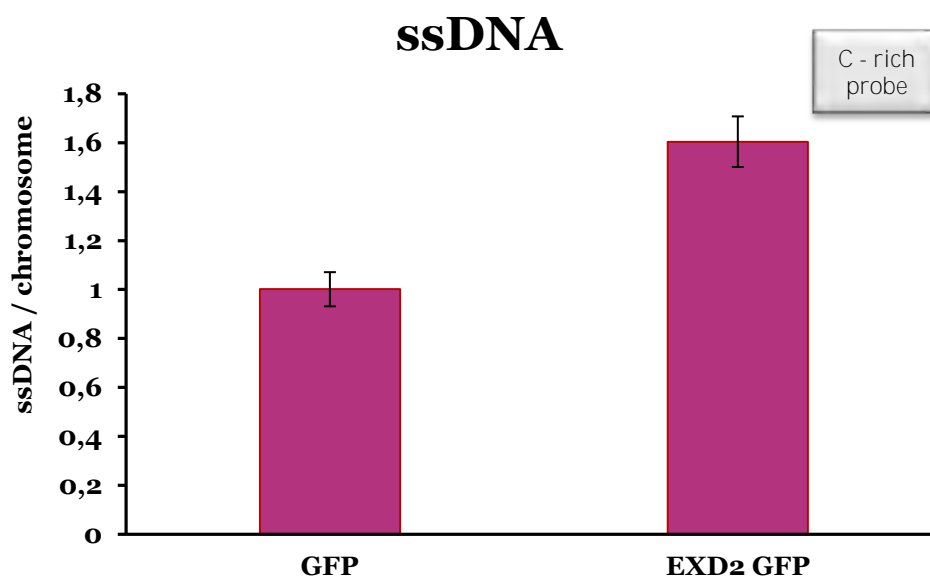
2. Ο ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ EXD2 ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ

Από τα πρώτα πειράματα προέκυψε ότι η EXD2 όντως εντοπίζεται στα τελομερή. Επίσης, από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι έχει δράση εξωνουκλεάσης 3' -> 5'. Για το λόγο αυτό, ακολουθήσαμε μία σειρά πειραμάτων, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν υπάρχει κάποιος λειτουργικός ρόλος της στις τελομερικές περιοχές.

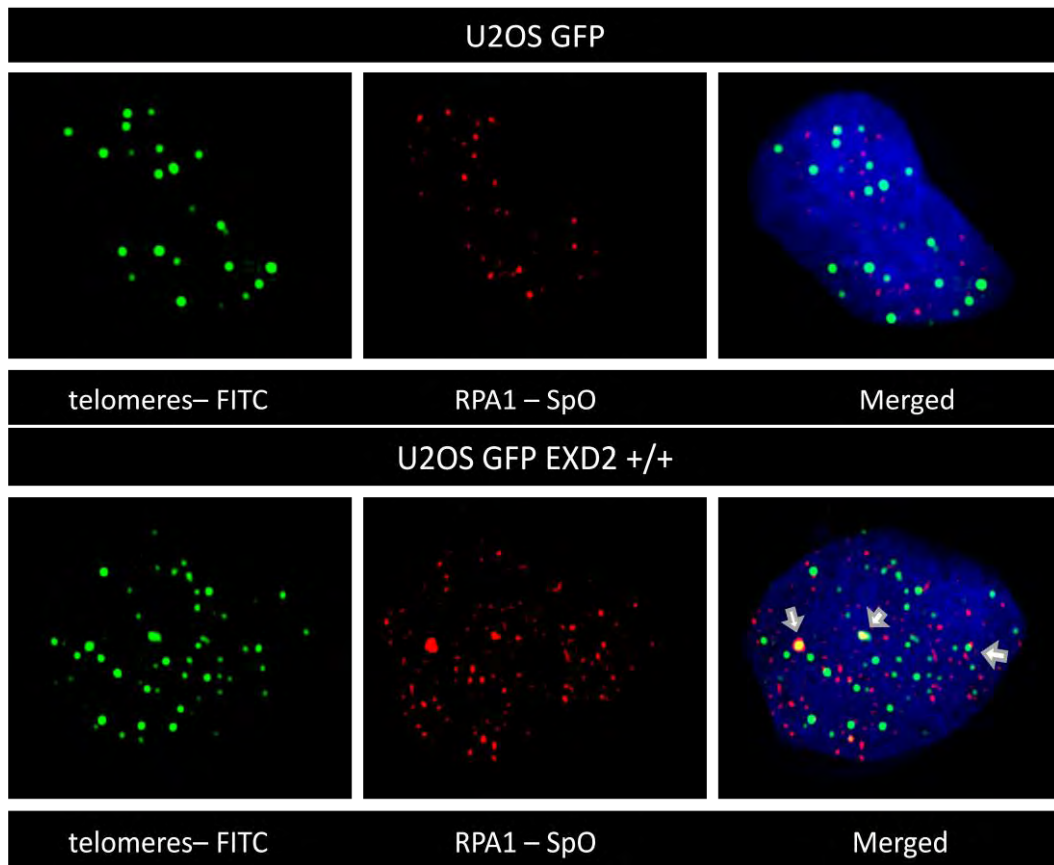
Το πρώτο πείραμα ήταν μία παραλλαγή του κλασσικού PNA-FISH που αφορά στον εντοπισμό μονόκλωνου DNA, το ND-FISH. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής CCCTAA (SpO), ο οποίος υβριδοποιείται μόνο με μονόκλωνες τελομερικές αλληλουχίες, καθώς το πείραμα διεξήχθη υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Στο διάγραμμα της εικόνας 18 φαίνεται το αυξημένο ποσοστό μονόκλωνου τελομερικού DNA στα κύτταρα U2OS GFP EXD2, συγκριτικά με τα κύτταρα U2OS GFP. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε ύστερα από καταμέτρηση 22 μεταφάσεων, με αναγωγή των σημάτων του

ανιχνευτή ανά χρωμόσωμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε ένα δεύτερο πείραμα ανοσοκυτταροχημείας με PNA-FISH για την πρωτεΐνη RPA1 και τα τελομερή. Για την RPA1 χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό RPA1 αντίσωμα, το οποίο σημάνθηκε με το δευτερογενές anti-mouse (Alexa Fluor 568) αντίσωμα, ενώ για τα τελομερή χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής CCCTAA (FITC). Η RPA1 σχηματίζει πυρηνικές εστίες και συνεντοπίζεται με τα τελομερή στους πυρήνες των κυττάρων U2OS GFP, αλλά φαίνεται ότι στα U2OS GFP EXD2 οι συνεντοπισμοί αυτοί είναι αυξημένοι (Εικόνες 19, 20). Στο πείραμα μετρήθηκαν οι συνεντοπισμοί της RPA1 με τα τελομερή σε 100 πυρήνες και η αναγωγή αυτών έγινε ανά πυρήνα.

Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η EXD2 έχει δράση εξωνουκλεάσης και στα τελομερή, καθώς η υπερέκφρασή της προκαλεί αυξημένο μονόκλωνο τελομερικό DNA.

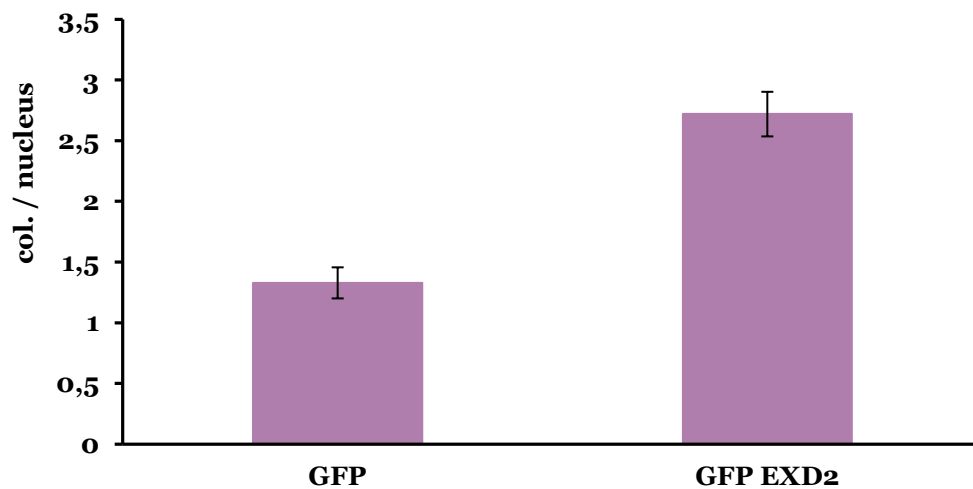


Εικόνα 18: Αυξημένο μονόκλωνο DNA στα τελομερή σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2. Το διάγραμμα αυτό προέκυψε από την καταμέτρηση των σημάτων του ανιχνευτή ανά χρωμόσωμα σε 22 μεταφάσεις.



Εικόνα 19: Στην εικόνα υποδεικνύονται με το άσπρο βέλος οι συνεντοπισμοί της RPA1 (κόκκινο) με τα τελομερή (πράσινο) σε κύτταρα U2OS GFP EXD2.

RPA1 - TEL COLOCALIZATIONS



Εικόνα 20: Συνεντοπισμός της RPA1 με τα τελομερή ανά πυρήνα στα κύτταρα U2OS GFP EXD2, συγκριτικά με τα U2OS GFP κύτταρα.

3. Η EXD2 ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

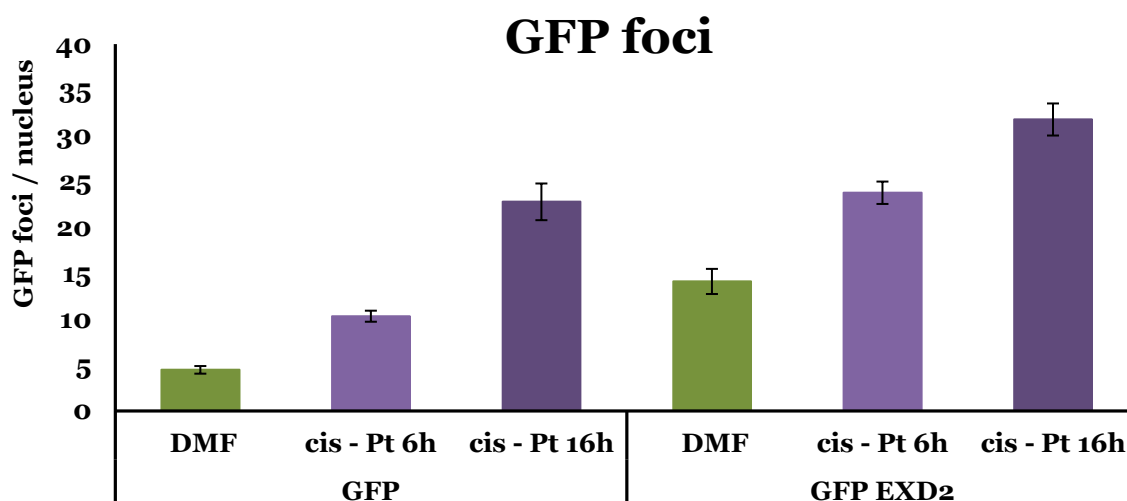
Δεδομένου ότι η EXD2 δρα ως εξωνουκλεάση και στα τελομερή, προέκυψε η υπόθεση ότι πιθανόν να εμπλέκεται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, τόσο για τη διατήρηση της αλληλουχίας τους από πιθανές μεταλλάξεις, όσο και για την επιμήκυνση αυτών μέσω του ALT. Συνεπώς, για να διαπιστωθεί η θεωρία αυτή, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα. Αρχικά, θελήσαμε να παρατηρήσουμε την επίδραση που έχουν στρεσογόνοι παράγοντες στο ποσοστό έκφρασης της EXD2, ενώ στη συνέχεια ελέγξαμε τον συνεντοπισμό της με την πρωτεΐνη PML.

Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα U2OS GFP και U2OS GFP EXD2, στα οποία χορηγήθηκε cis-Pt (Cisplatin) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνο επώασης. Ως αρνητικός μάρτυρας χορηγήθηκε στα κύτταρα ο διαλύτης της cis-Pt, δηλαδή το διμεθυλομεθαναμίδιο (DMF). Τόσο τα κύτταρα U2OS GFP (αρνητικός μάρτυρας), όσο και τα κύτταρα U2OS GFP EXD2 επώαστηκαν με DMF, 40 μ M cis-Pt για 6 ώρες και 20 μ M για 16 ώρες. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, για να παρατηρήσουμε διαφορετική έκφραση της EXD2, ήταν μία ανοσοκυτταροχημεία, στην οποία χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό GFP αντίσωμα. Για τη σήμανση του anti-GFP αντισώματος χρησιμοποιήθηκε το δευτερογενές anti-mouse (Alexa Fluor 568) αντίσωμα (Εικόνα 22). Παρατηρώντας το διάγραμμα στην εικόνα 21, διαπιστώνουμε ότι η παρουσία της cis - Pt αυξάνει τις πυρηνικές εστίες που σχηματίζει η πρωτεΐνη GFP στα κύτταρα U2OS GFP και η χιμαιρική GFP-EXD2 στα κύτταρα U2OS GFP EXD2, συγκριτικά με το DMF. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται όταν η επώαση των κυττάρων με cis-Pt διαρκεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επίσης, οι πυρηνικές εστίες που σχηματίζει η EXD2 στα U2OS GFP EXD2 αυξάνονται σε όλες τις συνθήκες συγκριτικά με τα U2OS GFP. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε από τη μέτρηση των GFP εστιών ανά πυρήνα σε αριθμό 100 πυρήνων.

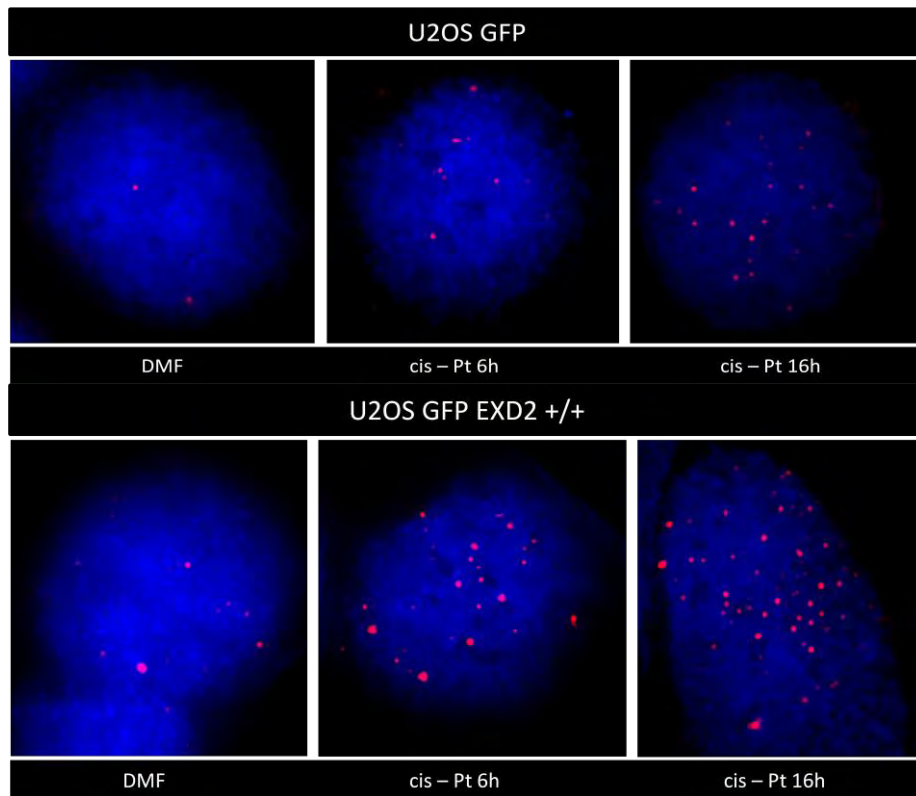
Το δεύτερο πείραμα αφορούσε την πιθανή ανάμιξη της EXD2 στον εναλλακτικό μηχανισμό επιδιόρθωσης των τελομερών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, χαρακτηριστικός φαινότυπος του μηχανισμού αυτού είναι η δημιουργία των APBs (ALT - associated PML bodies). Άρα, για να εμπλέκεται

η EXD2 στο μηχανισμό αυτό, θα πρέπει να συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη PML, η οποία αποτελεί βασικό μόριο των σωματιδίων αυτών. Στην ανοσοκυτταροχημεία που ακολούθησε, για τον εντοπισμό της PML χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό PML αντίσωμα, το οποίο σημάνθηκε με το δευτερογενές anti-mouse (Alexa Fluor 488), ενώ η EXD2 εντοπίστηκε με το anti-EXD2 μονοκλωνικό αντίσωμα, η σήμανση του οποίου έγινε με το anti-rabbit (Alexa Fluor 568). Για το πείραμα αυτό μετρήθηκαν οι συνεντοπισμοί της EXD2 με την PML σε 100 πυρήνες τόσο στα κύτταρα U2OS GFP (αρνητικός μάρτυρας), όσο και στα κύτταρα U2OS GFP EXD2. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι στα υπερεκφράζονται για την EXD2 κύτταρα, οι συνεντοπισμοί της με την PML ανά πυρήνα αυξάνονται, συγκριτικά με το μάρτυρα (Εικόνα 23).

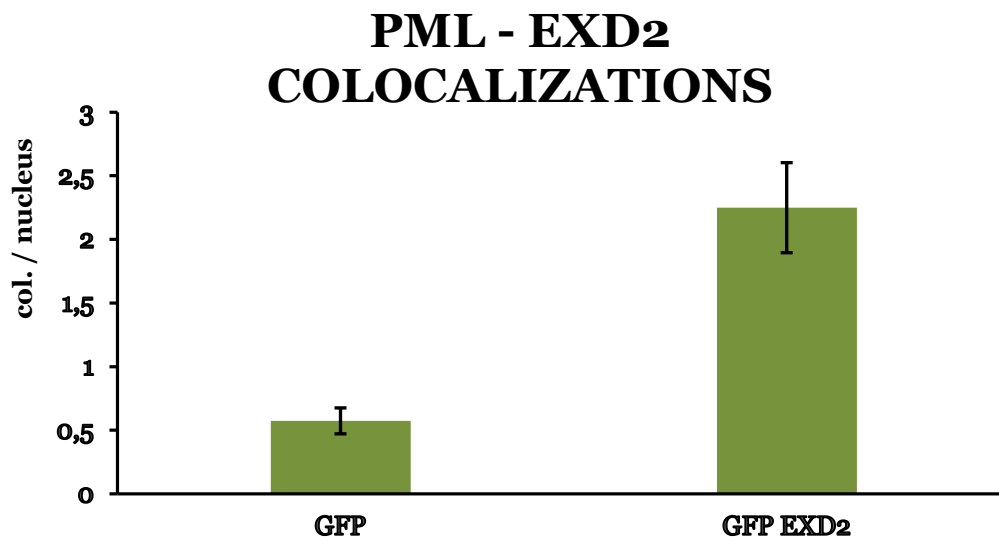
Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνουμε ότι η EXD2 συμμετέχει με κάποιο τρόπο στον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών, αλλά και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, καθώς η έκφρασή της αυξάνεται σε συνθήκες που δημιουργείται γενοτοξικό στρες.



Εικόνα 21: Διαγραμματική απεικόνιση της αυξημένης ποσότητας έκφρασης της EXD2. Η έκφραση της EXD2 αυξάνεται, ύστερα από δράση της cis-Pt, μεταξύ των κυττάρων U2OS GFP και U2OS GFP EXD2 και εξαρτάται από το χρόνο επώασής τους με την cis-Pt.



Εικόνα 22: Απεικόνιση των πυρηνικών GFP foci (κόκκινο) σε κύτταρα U2OS GFP (πάνω) και U2OS GFP EXD2 (κάτω), ύστερα από χορήγηση DMF (αριστερά), cis-Pt 40 μ M για 6 ώρες (μέση) και cis-Pt 20 μ M για 16 ώρες (δεξιά).



Εικόνα 23: Διαγραμματική απεικόνιση των συνεντοπισμών της πρωτεΐνης PML με την εξωνουκλεάση EXD2 ανά πυρήνα. Το ποσοστό των συνεντοπισμών αυξάνεται στα U2OS GFP EXD2 έναντι των U2OS GFP κυττάρων.

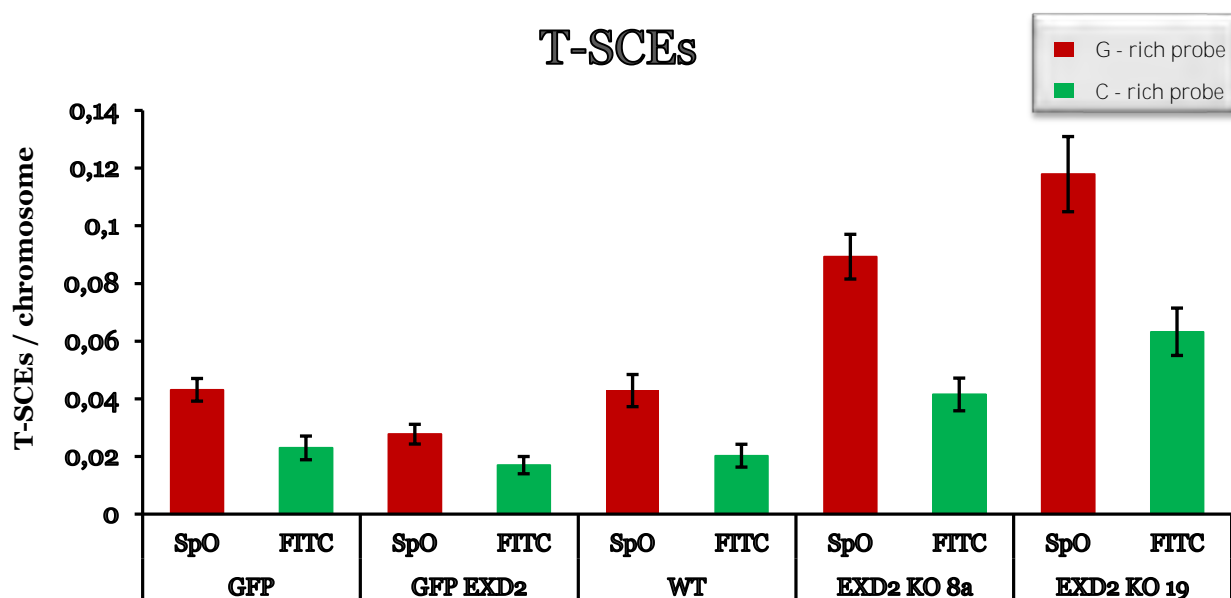
4. Η EXD2 ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΝ ΚΛΑΣΣΙΚΟ ΟΜΟΛΟΓΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ

Στην εισαγωγή αναλύθηκαν οι φαινότυποι που προκύπτουν από τους διάφορους μηχανισμούς επιδιόρθωσης που χρησιμοποιεί ο ALT μηχανισμός για την επιμήκυνση των τελομερών. Όταν ο εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών χρησιμοποιεί τον κλασσικό ομόλογο ανασυνδυασμό, για την ενίσχυση του 3' - βρόγχου του τελομερούς, ως εκμαγείο λειτουργεί συνήθως η εκάστοτε αδελφή χρωματίδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανασυνδυασμών μεταξύ των αδελφών χρωματίδων στο τελομερικό μέρος, ένα φαινόμενο που ονομάζεται T - SCEs (Telomeric Sister Chromatid Exchanges). Τα T-SCEs μπορούν να μετρηθούν μέσω της τεχνικής CO-FISH (Chromatid Orientation FISH), κατά την οποία κάθε πατρικός κλώνος του DNA σημαίνεται με το συμπληρωματικό ανιχνευτή, ενώ στα τελομερή όπου έχει συμβεί ανασυνδυασμός (T-SCE) υβριδίζονται και οι δύο ανιχνευτές, με αποτέλεσμα την εμφάνιση κίτρινου χρώματος (Εικόνα 25). Συνεπώς, το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διαπιστώσουμε αν η EXD2 συμμετέχει στον κλασσικό ομόλογο ανασυνδυασμό.

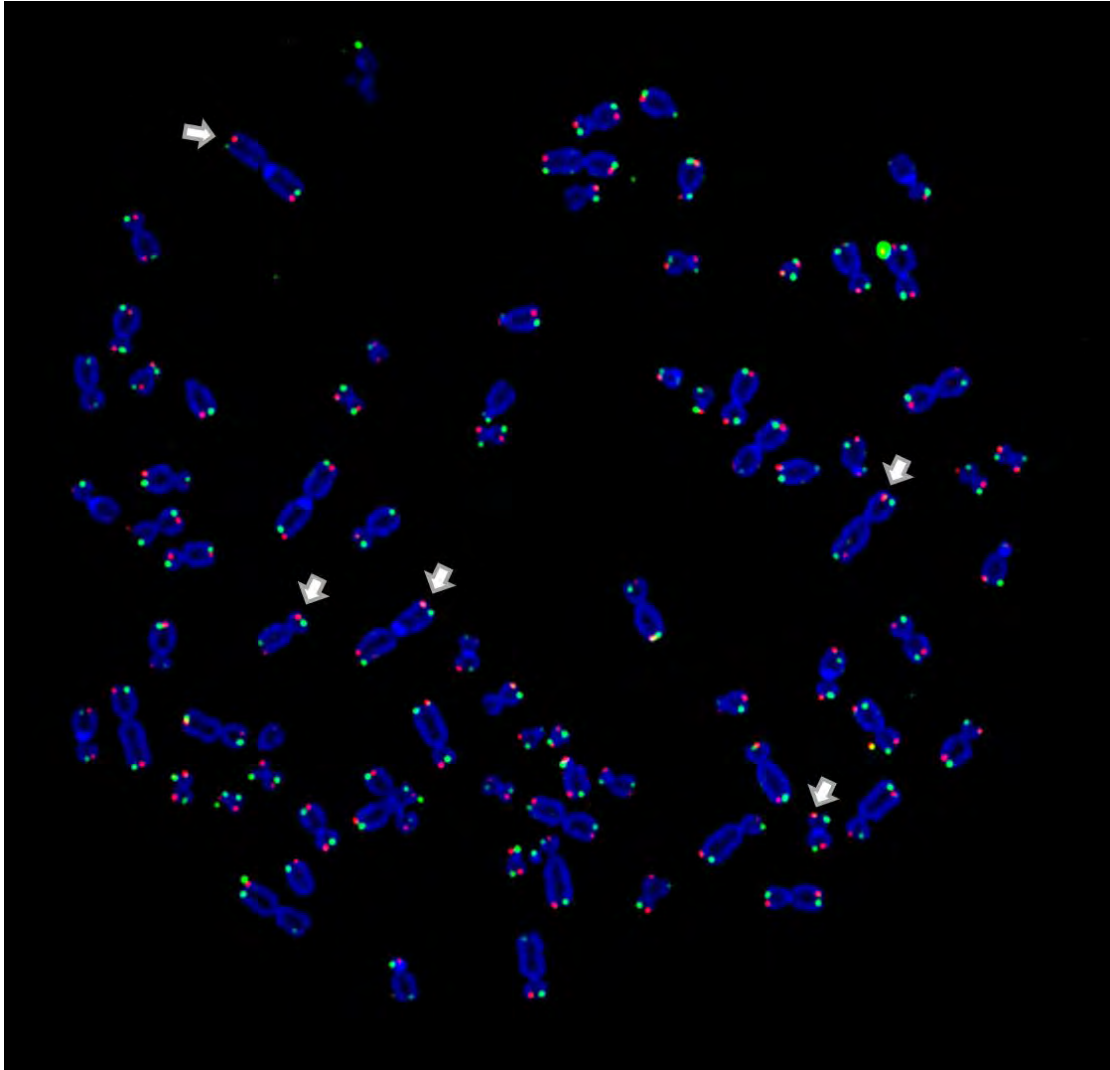
Σε αυτό το πείραμα υποβλήθησαν όλοι οι κλώνοι U2OS. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι TTAGGG (SpO) και CCCTAA (FITC). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 18 ώρες με την ουσία BrdU/C, δηλαδή για ένα κύκλο αντιγραφής. Το αποτέλεσμα καθορίστηκε ύστερα από την καταμέτρηση 25 μεταφάσεων. Σε κάθε μετάφαση μετρήθηκε ο αριθμός των T-SCEs ανά χρωμόσωμα και για τους δύο κλώνους του DNA. Σύμφωνα με τη διαγραμματική απεικόνιση, φαίνεται ότι παρουσία της EXD2 μειώνεται ο φαινότυπος, ενώ απουσία της ο αριθμός των T-SCEs αυξάνεται δραματικά. Πιο συγκεκριμένα, στα υπερεκφράζοντα για την EXD2 κύτταρα φαίνεται ότι ο αριθμός των T-SCEs μειώνεται σχεδόν στο μισό συγκριτικά με τα κύτταρα U2OS GFP. Επίσης, συγκρίνοντας τους δύο αρνητικούς μάρτυρες (U2OS GFP και U2OS WT) διαπιστώνουμε ότι ο φαινότυπος δεν αλλάζει, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο μετασχηματισμός των κυττάρων δεν αλλοιώνει τα αποτελέσματα. Τέλος, στους δύο κλώνους knock-out για την EXD2, δηλαδή σε αυτούς που δεν εκφράζουν καθόλου την εξωνουκλεάση, ο αριθμός των T-

SCEs διπλασιάζεται σε σχέση με τα κύτταρα U2OS αγρίου τύπου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η τάση αυτή ισχύει και για τους δύο κλώνους του DNA, οι οποίοι υποδηλώνονται στο διάγραμμα με διαφορετικό χρώμα ανάλογο του ανιχνευτή με τον οποίο υβριδοποιήθηκαν (Εικόνα 24).

Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι η EXD2 δεν συμμετέχει στον εναλλακτικό μηχανισμό επιδιόρθωσης των τελομερών μέσω του κλασσικού ομόλογου ανασυνδυασμού, αλλά έχει μία ανασταλτική δράση έναντι αυτού.



Εικόνα 24: Απεικόνιση του αριθμού των T-SCEs ανά χρωμόσωμα σε 25 μεταφάσης για τους δύο κλώνους του DNA ξεχωριστά. Ο κάθε κλώνος συμβολίζεται με το χρώμα του ανιχνευτή με τον οποίο υβριδοποιήθηκε. Παρουσία της EXD2 μειώνεται ο αριθμός των T-SCEs, ενώ απουσία της αυξάνεται δραματικά.



Εικόνα 25: Στην εικόνα παρουσιάζεται μία μίτωση κυττάρου U2OS EXD2 KO 8a στη φάση G2/M. Μέσω της τεχνικής CO-FISH, κάθε πατρικός κλώνος DNA έχει υβριδοποιηθεί με τον κατάλληλο ανιχνευτή. Ο κλώνος CCCTAA απεικονίζεται με κόκκινο, ενώ ο κλώνος με αλληλουχία TTAGGG παρουσιάζει πράσινα σήματα. Στους βραχίονες που εμφανίζονται και τα δύο χρώματα (κίτρινο), έχει συμβεί ανασυνδυασμός μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (T-SCE). Στην εικόνα αυτή παρατηρούμε μερικά τέτοια παραδείγματα (λευκά βέλη).

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δομή των τελομερών και ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν αποτελούν τη βάση της τελομερικής βιολογίας. Το τελομερές -όπως έχει ήδη αναφερθεί- είναι μία νουκλεοπρωτεϊνική περιοχή στα άκρα κάθε χρωμοσώματος και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες εξανουκλεοτιδικές αλληλουχίες [10]. Το μονόκλωνο 3' άκρο, στο οποίο καταλήγει κάθε τελομερές, οργανώνεται έτσι ώστε να δημιουργηθεί η θηλειά T, η οποία συγκροτείται από τη σελτερίνη [26, 34]. Η σελτερίνη είναι ένα πρωτεϊνικό εξαμερές σύμπλοκο (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, POT1) που διατηρεί σταθερή τη δομή του τελομερούς, με σκοπό να μην αναγνωρίζεται το τελομερές από τους παράγοντες DDR [28]. Σε αντίθετη περίπτωση, ένα δυσλειτουργικό τελομερές αποτελεί στόχο των ATM και ATR κινασών [112]. Η αναγνώριση αυτή προκαλεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων, που οδηγεί ψευδώς στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA [28].

Με την πάροδο των ετών, τα τελομερή μειώνονται σε μήκος. Αν κάποιο κύτταρο καταφέρει και ξεπεράσει το στάδιο της αντιγραφικής γήρανσης, απενεργοποιώντας την p53, τότε φτάνει σε μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο - πολύ μικρά και δυσλειτουργικά τελομερή- [123 - 125]. Όμως, κάποια κύτταρα ενεργοποιούν μηχανισμούς επιμήκυνσης των τελομερών τους, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν της κρίσης και να αθανатоποιούνται [126]. Η επιμήκυνση μπορεί να γίνει μέσω της τελομεράσης ή με τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) [127]. Ο ALT μηχανισμός σχετίζεται άμεσα με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, καθώς για να πραγματοποιηθεί η επιμήκυνση του τελομερούς, απαιτείται η σύνδεση του μονόκλωνου 3' - τελομερικού άκρου σε μία συμπληρωματική αλληλουχία. Συνεπώς, ο ALT μηχανισμός χρησιμοποιεί τόσο τον ομόλογο ανασυνδυασμό, όσο και τον BIR [150]. Για αυτό το λόγο, μόρια που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA είναι πολύ σημαντικά για τον ALT και κατά συνέπεια για την επιμήκυνση του εκάστοτε τελομερούς. Ένα από τα μόρια αυτά είναι η εξωνουκλεάση EXD2. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως εξωνουκλεάση 3' -> 5', συνεργατικά με το σύμπλοκο MRN [161].

Επειδή η δράση της EXD2 δεν έχει συσχετιστεί με τον ALT μηχανισμό στο παρελθόν, η έρευνα αυτή ξεκίνησε με το ερώτημα αν η EXD2 εντοπίζεται στα τελομερή. Μετά από διάφορα πειράματα και αναλύσεις, τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές, βρέθηκε ότι η εξωνουκλεάση EXD2 σχηματίζει πυρηνικές εστιές, οι οποίες συνεντοπίζονται με τις τελομερικές αλληλουχίες, αλλά και με την πρωτεΐνη TRF2. Το γεγονός λοιπόν ότι η EXD2 στρατολογείται στο τελομερές, υποδηλώνει κάποια πιθανή δράση της εκεί.

Στη συνέχεια, θεωρώντας ότι η EXD2 είναι μία εξωνουκλεάση, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα, για να διαπιστωθεί αν έχει την ίδια δράση και στο τμήμα του τελομερούς. Πράγματι, σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2 το μονόκλωνο τελομερικό DNA βρέθηκε αυξημένο. Κατά συνέπεια, αποδείχθηκε ότι έχει δράση εξωνουκλεάσης και στο τελομερές.

Όμως αντίθετα με το υπόλοιπο γονιδίωμα, στο τελομερές εκτός των μηχανισμών για την επιδιόρθωση του DNA, λειτουργεί και ο ALT, ο οποίος χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, αλλά έχει διαφορετική λειτουργία. Για αυτό το λόγο, ήταν απαραίτητο να διερευνήσουμε που συμμετέχει η EXD2. Αρχικά, ελέγξαμε την περίπτωση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο (cis-Pt), το οποίο προκαλεί καταστροφή του DNA. Τα κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκε το φάρμακο, παρουσίασαν αυξημένη έκφραση της EXD2. Άρα, η εξωνουκλεάση αυτή συμμετέχει στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και στο τελομερές. Στη συνέχεια των πειραμάτων, φάνηκε ότι η EXD2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη PML, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό των APBs. Τα APBs συγκροτούνται από τελομερικές αλληλουχίες, πρωτεΐνες της σελετερίνης, παράγοντες DDR και την PML. Επίσης, συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό των τελομερικών άκρων και αποτελούν χαρακτηριστικό φαινότυπο του ALT μηχανισμού [145, 146]. Δεδομένου ότι η EXD2 αποτελεί συστατικό των APBs και διακρίνοντας ενίσχυση του φαινομένου αυτού σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την EXD2, συμπεραίνουμε ότι η EXD2 συμμετέχει και στον ALT μηχανισμό.

Εντούτοις, δεν ήταν γνωστό σε ποιο μηχανισμό εμπλέκεται η εξωνουκλεολυτική δράση της EXD2. Ένας άλλος χαρακτηριστικός φαινότυπος του ALT μηχανισμού είναι ο σχηματισμός ανασυνδυασμών μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (T-SCEs). Ο φαινότυπος αυτός προκύπτει όταν ο ALT διεξάγεται μέσω του κλασσικού ομόλογου ανασυνδυασμού. Πειράματα CO-FISH έδειξαν ότι σε κύτταρα που υπερεκφράζεται η EXD2 μειώνεται ο αριθμός των T-SCEs, ενώ παράλληλα απουσία της ο φαινότυπος αυτός αυξάνεται δραματικά. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ξεκάθαρα ότι η EXD2 όχι μόνο δεν συμμετέχει στον κλασσικό ομόλογο ανασυνδυασμό, αλλά παρουσιάζει μία ανασταλτική δράση έναντι αυτού.

Παρόλα αυτά, από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η EXD2 λειτουργεί συνεργατικά με το σύμπλοκο MRN [161]. Όμως, το σύμπλοκο αυτό δεν λειτουργεί μόνο στα πρώτα στάδια του κλασσικού ομόλογου ανασυνδυασμού. Το MRN εμπλέκεται και με άλλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όπως ο BIR και ο MMEJ. Για αυτό το λόγο, θα πρέπει να μελετηθούν φαινότυποι των μηχανισμών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηριστικό του BIR μηχανισμού είναι ότι οι κλώνοι που προκύπτουν είναι αποτέλεσμα συντηρητικού τρόπου αντιγραφής. Αντίστοιχα, όταν ο ALT λειτουργεί μέσω του MMEJ μηχανισμού, δημιουργούνται “*end - to - end fusions*”, δηλαδή τα τελομερή των χρωμοσωμάτων «κολλάνε» μεταξύ τους. Άλλα μόρια τα οποία θα πρέπει να μελετηθούν είναι οι πρωτεΐνες SLX4, ERCC4 και BLM, οι οποίες καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο θα λυθεί ένα Holliday Junction και κατ’ επέκταση το μηχανισμό επιδιόρθωσης. Τέλος, οι λιγάσες 1 και 3 αποτελούν εξειδικευμένα μόρια των 2 επιμέρους MMEJ μηχανισμών, όπως και η Polθ.

Η κατανόηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης στα τελομερή θα αποτελέσει ένα σημαντικό όπλο για τη θεραπεία των ALT καρκίνων. Ανακαλύπτοντας καθοριστικά μόρια για τον κάθε μηχανισμό, θα μπορούμε να επάγουμε τη θνησιμότητα των καρκινικών κυττάρων με αναστολείς των μορίων αυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Goodpasture C, Bloom SE, Hsu TC, Arrighi FE (1976) *Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks?* Am J Hum Genet 28(6):559–566
2. Garavis M, Gonzalez C, Villasante A (2013) *On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution.* Genome Biol Evol 5(6): 1142–1150
3. Watson JD. *Origin of concatemeric DNA.* Nature New Biology. 1972; 239:197–201.
4. Olovnikov AM (1971) *Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides.* Dokl Akad Nauk SSSR 201(6):1496–1499
5. Olovnikov AM (1973) *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon.* J Theor Biol 41(1):181–190
6. Watson JD (1972) *Origin of concatemeric T7 DNA.* Nat New Biol 239(94):197–201
7. De Lange T (2005) *Telomere-related genome instability in cancer.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol 70:197–204
8. O'Sullivan RJ, Karlseder J (2010) *Telomeres: protecting chromosomes against genome instability.* Nat Rev Mol Cell Biol 11(3):171–181
9. Egan ED, Collins K (2012) *Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins.* RNA 18(10): 1747–1759
10. Gall, JG. Beginning of the end: origins of the telomere concept. In: Blackburn, EH.; Greider, CW., editors. *Telomeres.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview, NY: 1995. p. 1-10.
11. Blackburn EH, Gall JG. *A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena.* J Mol Biol. 1978; 120:33–53. [PubMed: 642006]
12. Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P, Prescott DM. *All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus.* Proceedings of the National Academy of Science. 1981; 78:3015–3019.
13. Virginia A. Zakian (2012) *Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes.* Exp Cell Res 318(12): 1456–1460.
14. Morin GB (1989) *The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats.* Cell 59(3):521–529
15. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD et al (1988) *A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A 85(18):6622–6626
16. Giraud-Panis MJ, Pisano S, Poulet A, Le Du MH, Gilson E (2010) *Structural identity of telomeric complexes.* FEBS Lett 584(17):3785–3799

17. Lorite P, Carrillo JA, Palomeque T (2002) *Conservation of (TTAGG)(n) telomeric sequences among ants (Hymenoptera, Formicidae)*. J Hered 93(4):282–285
18. Zielke S, Bodnar A (2010) *Telomeres and telomerase activity in scleractinian corals and Symbiodinium spp.* Biol Bull 218(2):113–121
19. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR et al (2011) *Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination*. Aging Cell 10(5):761–768
20. Bischoff C, Graakjaer J, Petersen HC, Hjelmborg J, Vaupel JW, Bohr V et al (2005) *The heritability of telomere length among the elderly and oldest-old*. Twin Res Hum Genet 8(5):433–439
21. Forsyth NR, Elder FF, Shay JW, Wright WE (2005) *Lagomorphs (rabbits, pikas and hares) do not use telomere-directed replicative aging in vitro*. Mech Ageing Dev 126(6-7):685–691
22. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening*. Cell 88(5):657–666
23. Chai W, Shay JW, Wright WE (2005) *Human telomeres maintain their overhang length at senescence*. Mol Cell Biol 25(6):2158–2168
24. Hemann MT, Greider CW. 1999. *G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells*. Nucleic Acids Res. 27:3964–69
25. Nikaido R, Haruyama T, Watanabe Y, Iwata H, Iida M, et al. 1999. *Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice*. Genes Cells 4:563–72
26. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, et al. 1999. *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell 97:503–14
27. Munoz-Jordan JL, Cross GA, de Lange T, Griffith JD. 2001. *t-loops at trypanosome telomeres*. EMBO J. 20:579–88
28. Palm W, de Lange T. *How shelterin protects mammalian telomeres*. Annu Rev Genet. 2008; 42:301–334. [PubMed: 18680434]
29. Ichikawa Y, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. (2015) *Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres*. Biomol Concepts. 6(1):67-75.
30. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997) *Structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature 389, 251–260.
31. Luger, K. (2006) *Dynamic nucleosomes*. Chromosome Res. 14, 5–16.
32. Wright, J. H., Gottschling, D. E. and Zakian, V. A. (1992) *Saccharomyces telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure*. Genes Dev. 6, 197–210.
33. Tommerup H, Dousmanis A, De Lange T. *Unusual chromatin in human telomeres*. Mol Cell Biol 1994; 14: 5777–85.
34. de Lange T. (2005) *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev. 19:2100–10
35. Chong L1, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T. (1995) *A human telomeric protein*. Science. 270(5242):1663-7.
36. <https://www.uniprot.org/uniprot/P54274>

37. Billaud et al. (1997) *Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein*. *Nat Genet.* 17(2):236-9.
38. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. 1997. *Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2*. *Nat. Genet.* 17:231–35
39. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15554>
40. Fairall L, Chapman L, Moss H, de Lange T, Rhodes D. 2001. *Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2*. *Mol. Cell* 8:351–61
41. Celli G, de Lange T. 2005. *DNA processing not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion*. *Nat. Cell Biol.* 7:712–18
42. Hanaoka S, Nagadoi A, Yoshimura S, Aimoto S, Li B, et al. 2001. *NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA binding domains*. *J. Mol. Biol.* 312:167–75
43. Ye JZ, Donigian JR, Van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, et al. 2004. *TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres*. *J. Biol. Chem.* 279:47264–71
44. Chen Y, Yang Y, van Overbeek M, Donigian JR, Baciú P, et al. 2008. *A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins*. *Science* 319:1092–96
45. O'Connor MS, Safari A, Xin H, Liu D, Songyang Z. 2006. *A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11874–79
46. Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. 2004. *A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2*. *Curr. Biol.* 14:1621–31
47. Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegeler A, et al. 2004. *PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres*. *Nat. Cell Biol.* 6:673–80
48. Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, et al. 2004. *POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex*. *Genes Dev.* 18:1649–54
49. Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, et al. 2007. *TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase*. *Nature* 445:559–62
50. Baumann P, Cech TR. 2001. *Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans*. *Science* 292:1171–75
51. Kelleher C, Kurth I, Lingner J. 2005. *Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 25:808–18
52. Murzin AG. 1993. *OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for nonhomologous sequences*. *EMBO J.* 12:861–67
53. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. (1998) *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. *Science.* 279(5349):349-52.
54. Vaziri H1, Benchimol S. (1998) *Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span*. *Curr Biol.* 8(5):279-82.

55. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. (1999) *p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2*. *Science*. 283(5406):1321-5.
56. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. (1998) *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. *Cell*. 92(3):401-13.
57. Brnzei D, Foiani M. (2008) *Regulation of DNA repair throughout the cell cycle*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(4):297-308.
58. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. (2004) *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85.
59. Brnzei, D. & Foiani, M. (2005) *The DNA damage response during DNA replication*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 568–575.
60. Jiricny, J. (2006) *The multifaceted mismatch-repair system*. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–346.
61. Brnzei, D. & Foiani, M. (2007) *Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks*. *DNA Repair* 6, 994–1003.
62. Lehmann, A. R. *et al.* (2007) *Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch*. *DNA Repair* 6, 891–899.
63. Liu B, Yip RK, Zhou Z (2012). *Chromatin remodeling, DNA damage repair and aging*. *Curr. Genomics*. 13 (7): 533–47.
64. Williams RS, *et al.* (2008) *Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair*. *Cell*. 135:97–109.
65. Paull TT, Gellert M. (1999) *Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex*. *Genes Dev*. 13:1276–88.
66. Paull TT, Gellert M. (1998) *The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double strand breaks*. *Mol Cell*. 1:969–79.
67. de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. (2001) *Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends*. *Mol Cell*. 8:1129–35.
68. Williams RS, *et al.* (2008) *Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair*. *Cell*. 135:97–109.
69. Hopfner KP, *et al.* (2002) *The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair*. *Nature*. 418:562–6.
70. Lloyd J, *et al.* (2009) *A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage*. *Cell*. 139:100–11.
71. Williams RS, *et al.* (2009) *Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair*. *Cell*. 139:87–99.
72. Hopkins BB, Paull TT. (2008) *The P. furiosus mre11/rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break*. *Cell*. 135:250–60.
73. Farah JA, Cromie GA, Smith GR. (2009) *Ctp1 and Exonuclease 1, alternative nucleases regulated by the MRN complex, are required for efficient meiotic recombination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:9356–61.
74. Mimitou EP, Symington LS. (2009) *DNA end resection: many nucleases make light work*. *DNA Repair (Amst)*. 8:983–95.
75. Hartlerode AJ., Scully R. (2009) *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. *Biochem J*. 423(2): 157–168.

76. Sung, P. and Klein, H. (2006) *Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 739–750
77. Sy, S. M., Huen, M. S. and Chen, J. (2009) *PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 7155–7160
78. Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B. and Yu, X. (2009) *PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response*. Curr. Biol. 19, 524–529
79. Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. and Bradley, A. (1997) *Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking BRCA2*. Nature 386, 804–810
80. Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V. and Bartel, P. L. (1997) *RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2*. J. Biol. Chem. 272, 31941–31944
81. Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L. and Venkitaraman, A. R. (2002) *Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex*. Nature 420, 287–293
82. Johnson, R. D. and Jasin, M. (2000) *Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells*. EMBO J. 19, 3398–3407
83. Nagaraju, G., Odate, S., Xie, A. and Scully, R. (2006) *Differential regulation of short and long tract gene conversion between sister chromatids by Rad51C*. Mol. Cell. Biol. 26, 8075–8086
84. Richardson, C., Moynahan, M. E. and Jasin, M. (1998) *Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations*. Genes Dev. 12, 3831–3842
85. Liu, Y. and West, S. C. (2004) *Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 937–944
86. Lydeard, J. R., Jain, S., Yamaguchi, M. and Haber, J. E. (2007) *Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32*. Nature 448, 820–823
87. Malkova, A., Ira, G. (2013) *Break-induced replication: functions and molecular mechanism*. Curr Opin Genet Dev. 23(3):271-9
88. Franchitto, A., Oshima, J. & Pichierri, P. (2003) *The G2-phase decatenation checkpoint is defective in Werner syndrome cells*. Cancer Res. **63**, 3289–3295.
89. Deming, P. B. *et al.* (2001) *The human decatenation checkpoint*. Proc. Natl Acad. Sci. USA **98**, 12044–12049
90. Deming, P. B., Flores, K. G., Downes, C. S., Paules, R. S. & Kaufmann, W. K. (2002) *ATR enforces the topoisomerase II-dependent G2 checkpoint through inhibition of Plk1 kinase*. J. Biol. Chem. **277**, 36832–36838
91. Gottlieb, T. M. and Jackson, S. P. (1993) *The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen*. Cell 72, 131–142
92. Yoo, S. and Dynan, W. S. (1999) *Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein*. Nucleic Acids Res. 27, 4679–4686

93. Yaneva, M., Kowalewski, T. and Lieber, M. R. (1997) *Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies*. EMBO J. 16, 5098–5112
94. DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D. and Chu, G. (2002) *Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase*. EMBO J. 21, 3192–3200
95. Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and Lieber, M. R. (2002) *Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination*. Cell 108, 781–794
96. Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A. and de Villartay, J. P. (2001) *Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency*. Cell 105, 177–186
97. Ma, Y., Schwarz, K. and Lieber, M. R. (2005) *The Artemis: DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps*. DNA Repair 4, 845–851
98. Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M. and Lieber, M. R. (1997) *Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells*. Nature 388, 492–495
99. Muvarak N, Kelley S, Robert C, Baer MR, Perrotti D, Gambacorti-Passerini C, Civin C, Scheibner K, Rassool FV (2015). *"c-MYC Generates Repair Errors via Increased Transcription of Alternative-NHEJ Factors, LIG3 and PARP1, in Tyrosine Kinase-Activated Leukemias"*. Mol. Cancer Res. 13 (4): 699–712.
100. Sfeir A, Symington LS, (2015) *Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway?*. Trends Biochem Sci. 40(11):701-714.
101. S. Sinha, D. Villarreal, E.Y. Shim, S.E. Lee, *Risky business: Microhomology-mediated end joining*, Mutat Res, 788 (2016) 17-24.
102. H. Wang, X. Xu, Microhomology-mediated end joining: new players join the team. Cell Biosci. 2017; 7: 6.
103. S.J. Black, E. Kashkina, T. Kent, R.T. Pomerantz, (2016) *DNA Polymerase theta: A Unique Multifunctional End-Joining Machine*, Genes (Basel), 7.
104. L.N. Truong, Y. Li, L.Z. Shi, P.Y. Hwang, J. He, H. Wang, N. Razavian, M.W. Berns, X. Wu, *Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 110 (2013) 7720-7725.
105. S. Takeda, K. Nakamura, Y. Taniguchi, T.T. Paull, *Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination*, Mol Cell, 28 (2007) 351-352.
106. E. Cannavo, P. Cejka, *Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks*, Nature, 514 (2014) 122-125.
107. T.T. Paull, *Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection*, DNA Repair (Amst), 9 (2010) 1283-1291.
108. S.K. Deng, B. Gibb, M.J. de Almeida, E.C. Greene, L.S. Symington, *RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks*, Nat Struct Mol Biol, 21 (2014) 405-412.

109. S. Ahrabi, S. Sarkar, S.X. Pfister, G. Pirovano, G.S. Higgins, A.C. Porter, T.C. Humphrey, ***A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining***, *Nucleic Acids Res*, 44 (2016) 5743-5757
110. J.L. Ma, E.M. Kim, J.E. Haber, S.E. Lee, ***Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku Independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences***, *Mol Cell Biol*, 23 (2003) 8820-8828.
111. M. Hogg, A.E. Sauer-Eriksson, E. Johansson, ***Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase theta***, *Nucleic Acids Res*, 40 (2012) 2611-2622.
112. Shiloh Y. 2003. ***ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity***. *Nat. Rev. Cancer* 3:155–68
113. Falck, J., Coates, J. & Jackson, S. P. ***Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage***. *Nature* 434, 605–611 (2005).
114. You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T. & Russell, P. ***ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1***. *Mol. Cell Biol*. 25, 5363–5379 (2005).
115. Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG. (2006) ***TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex***. *Cell*. 124(5):943-55.
116. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) ***Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts***. *Nature* 345(6274):458–460
117. Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C., and R. C. Allsopp. 1992. ***The telomere hypothesis of cellular aging***. *Exp. Gerontol*. 27:375–382.
118. Hayflick, L. 1965. ***The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains***. *Exp. Cell Res*. 37:614–636.
119. Wright, W. E., and J. W. Shay. 1992. ***The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization***. *Exp. Gerontol*. 27:383–389.
120. Hara, E. T., A. Shinozaki, S. Nakada, and K. Oda. 1991. ***Cooperative effect of antisense-RB and antisense-p53 in the regulation of cellular senescence***. *Exp. Cell Res*. 179:528–534.
121. Shay, J. W., O. Peirera-Smith, and W. E. Wright. 1991. ***A role for both RB and p53 in the regulation of the cellular senescence***. *Exp. Cell Res*. 196: 33–39.
122. Wright, W. E., O. M. Pereira-Smith, and J. W. Shay. 1989. ***Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts***. *Mol. Cell. Biol*. 9:3088–3092.
123. Counter, C. M., A. A. Avillion, C. E. LeFeeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. ***Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity***. *EMBO J*. 11:1921–1929.
124. Shay, J. W., W. E. Wright, D. Brasiskyte, and B. A. Van der Haegen. 1993. ***E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts***. *Oncogene* 8:1407–1413.
125. Shay, J. W., and W. E. Wright. 1989. ***Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 larger T antigen***. *Exp. Cell Res*. 184:109–118.

126. Greider, C. W., A. B., and E. H. Blackburn. 1985. *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell 43:405–413.
127. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, et al. 1994. *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science 266:2011–15
128. Greider CW, Blackburn EH (1987) *The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity*. Cell 51(6):887-898
129. Greider CW, Blackburn EH (1989) *A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis*. Nature 337(6205):331–337
130. https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:2.7.7.49
131. Feng, J., W. D. Funk, S. S. Wang, S. L. Weinrich, A. A. Avilion, C. P. Chiu, R. R. Adams, E. Chang, R. C. Allsopp, J. Yu, et al. 1995. *The RNA component of human telomerase*. Science 269:1236–1241
132. Yu-Sheng Cong, Woodring E. Wright, and Jerry W. Shay (2002) *Human Telomerase and Its Regulation*. Microbiol Mol Biol Rev. 66(3): 407–425.
133. Kelleher, C., Teixeira, M. T., Forstemann, K., and Lingner, J. Telomerase: *biochemical considerations for enzyme and substrate*. Trends Biochem. Sci., 2002 Nov;27(11):572-9.
134. Collins K, Greider CW. *Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation*. Genes & Dev 1993;7:1364–1376.
135. Lue NF. *A physical and functional constituent of telomerase anchor site*. J Biol Chem. 2005 Jul 15;280(28):26586-91
136. Aaron R. Robart, Kathleen Collins, (2011) *Networked Human Telomerase Domain Interactions Capture the Template-paired Substrate and Single-stranded Product for Processive Elongation*. Mol Cell. 42(3): 308–318.
137. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. (2010) *Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation*. Biochemistry (Mosc). 75(13):1563-83.
138. R. Alex Wu, Heather E. Upton, Jacob M. Vogan and Kathleen Collins (2017) *Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis*. Annu Rev Biochem. 86: 439–460.
139. Lundblad V, Blackburn EH (1993) *An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence*. Cell 73(2):347–360
140. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) *Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines*. Nat Med 3(11):1271–1274
141. Cesare, A. J. & Griffith, J. D. *Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops*. Mol. Cell. Biol. 24, 9948–9957 (2004).

142. Wang, R. C., Smogorzewska, A. & de Lange, T. ***Homologous recombination generates t loop-sized deletions at human telomeres.*** Cell 119, 355–368 (2004).
143. Nabetani, A. & Ishikawa, F. ***Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells.*** Mol. Cell. Biol. 29, 703–713 (2009).
144. Henson, J. D. et al. ***DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative lengthening-of telomeres activity.*** Nature Biotech. 27, 1181–1185 (2009).
145. Yeager, T. R. et al. ***Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body.*** Cancer Res. 59, 4175–4179 (1999).
146. P Kroustallaki, S Gagos (2015) ***Structure and Functions of Telomeres in Organismal Homeostasis and Disease***, Genomic Elements in Health, Disease and Evolution, Springer New York
147. Murnane, J. P., Sabatier, L., Marder, B. A. & Morgan, W. F. ***Telomere dynamics in an immortal human cell line.*** EMBO J. 13, 4953–4962 (1994).
148. Perrem, K., Colgin, L. M., Neumann, A. A., Yeager, T. R. & Reddel, R. R. ***Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT transfected GM847 cells.*** Mol. Cell. Biol. 21, 3862–3875 (2001).
149. Londono-Vallejo, J. A., Der-Sarkissian, H., Cazes, L., Bacchetti, S. & Reddel, R. R. ***Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange.*** Cancer Res. 64, 2324–2327 (2004).
150. Cesare AJ1, Reddel RR. (2010) ***Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications.*** Nat Rev Genet. 11(5):319-30.
151. Chiruvella, K.K. et al. (2013) ***Repair of double-strand breaks by end joining.*** Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5, a012757
152. Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R. & Reddel, R. R. ***Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells.*** Oncogene 21, 598–610 (2002).
153. Mimitou EP, Symington LS. ***Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing.*** Nature. 2008; 455:770–774.
154. Sartori AA, et al. ***Human CtIP promotes DNA end resection.*** Nature. 2007; 450:509–514.
155. Nicolette ML, et al. ***Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks.*** Nature structural & molecular biology. 2010; 17:1478–1485
156. Cannavo E, Cejka P. ***Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks.*** Nature. 2014; 514:122-125.
157. Paull TT, Gellert M. ***The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double strand breaks.*** Molecular cell. 1998; 1:969–979.

158. Garcia V, Phelps SE, Gray S, Neale MJ. ***Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1.*** Nature. 2011; 479:241–244.
159. Jazayeri A, Balestrini A, Garner E, Haber JE, Costanzo V. ***Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity.*** The EMBO journal. 2008; 27:1953–1962.
160. Shibata A, et al. ***DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities.*** Molecular cell. 2014; 53:7-18.
161. Broderick R., Nieminuszczy J., Baddock H.T., Deshpande R.A., Gileadi O., Paull T.T., McHugh P.J., Niedzwiedz W. (2016) ***EXD2 promotes homologous recombination by facilitating DNA end resection.*** Nat. Cell Biol. 18:271-280