

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

***In silico* και *in vivo* ανάλυση της αντιγραφής
και επιδιόρθωσης του DNA**

Μαξούρη Στυλιανή

Διδακτορική Διατριβή

Πάτρα, 2019

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από τους πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

κα Λυγερού Ζωή: Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
(Επιβλέπουσα καθηγήτρια)

κος Ταραβήρας Σταύρος: Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

κος Λυγερός Ιωάννης: Καθηγητής Τμήματος Ηλεκτρολόγων Μηχανικών του
Ελβετικού Ομοσπονδιακού Ινστιτούτου Τεχνολογίας Ζυρίχης (ETH Zürich)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

κα Λυγερού Ζωή: Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
(Επιβλέπουσα καθηγήτρια)

κος Ταραβήρας Σταύρος: Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

κος Λυγερός Ιωάννης: Καθηγητής Τμήματος Ηλεκτρολόγων Μηχανικών του
Ελβετικού Ομοσπονδιακού Ινστιτούτου Τεχνολογίας Ζυρίχης (ETH Zürich)

κος Ανδρουλάκης Γεώργιος: Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Διοίκησης Επιχειρήσεων
Πανεπιστήμιο Πατρών

κος Ζαρκάδης Ιωάννης: Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

κα Παπαχατζοπούλου Αδελφάντσια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Πατρών

κος Παυλόπουλος Γεώργιος: Ερευνητής Β' Βαθμίδας Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών
Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ"

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κυρία Ζωή Λυγερού, καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας που μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη διδακτορική μου διατριβή ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Μέσα από τις συζητήσεις μας και τη συνεργασία μας αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις και εφόδια, ενώ η πολύτιμη καθοδήγησή της κατά το σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον κύριο Σταύρο Ταραβήρα, καθηγητή Φυσιολογίας μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την εξαιρετική συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κύριο Ιωάννη Λυγερό, καθηγητή στο ΕΤΗ Zurich για ειλικρινές ενδιαφέρον του και την συνεισφορά του στη συγκεκριμένη εργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γεώργιο Ανδρουλάκη, τον καθηγητή κ. Ιωάννη Ζαρκάδη, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Αδαμαντία Παπαχατζοπούλου και τον ερευνητή κ. Γεώργιο Παυλόπουλο για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην επιτροπή και για την πολύτιμη συμβολή τους.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη των εργαστηρίων Γενικής Βιολογίας και Φυσιολογίας και ιδιαίτερα τους Μαρίνα, Αλεξάνδρα, Μιχάλη, Ανδρέα, Ειρήνη, Τίνα, Θοδωρή και Βίκυ για τη συνεργασία, τις συζητήσεις μας και τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός του εργαστηρίου. Τους φίλους μου για τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους. Η αμέριστη υποστήριξη και βοήθεια που μου προσέφεραν απλόχερα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	11
Abstract.....	13
1. Εισαγωγή	14
1.1 Η αντιγραφή του DNA	14
1.1.1 Έναρξη της αντιγραφής του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα	14
1.2 Χρονική ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής	19
1.2.1 Χρωματινικό περιβάλλον και χρωμοσωμική θέση	19
1.2.2 Πρωτεΐνες ρυθμιστές του προγράμματος αντιγραφής	20
1.2.3 Χρονική ρύθμιση αντιγραφής μέσω ανταγωνισμού	22
1.2.4 Τρισδιάστατη οργάνωση του πυρήνα.....	22
1.3 Μηχανισμοί παρεμπόδισης της επαναντιγραφής	25
1.3.1 Υπερέκφραση των παραγόντων Cdc6/Cdc18 και Cdt1 προκαλούν επαναντιγραφή στον <i>S.pombe</i>	28
1.3.2 Επαναντιγραφή των τελομερικών περιοχών στον <i>S.pombe</i>	31
1.3.3 Επαναντιγραφή του DNA σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.....	32
1.4 Η επαναντιγραφή του DNA οδηγεί σε αντιγραφικό στρες και γονιδιωματική αστάθεια	34
1.5 Ενεργοποίηση μηχανισμών απόκρισης στη βλάβη κατά την επαναντιγραφή γονιδιώματος.....	35
1.6 Επαναντιγραφή DNA και καρκινογένεση.....	37
1.7 Γονιδιακή ενίσχυση.....	39
1.8 Μηχανισμοί πρόκλησης γονιδιακής ενίσχυσης	41
1.8.1 Γονιδιακή ενίσχυση έπειτα από επαναντιγραφή γονιδιώματος.....	41
1.8.2 Γονιδιακή ενίσχυση μέσω του μηχανισμού BFB	44
1.8.3 Γονιδιακή ενίσχυση μέσω του μηχανισμού FoSTeS	46
1.9 Γονιδιακή ενίσχυση και καρκινογένεση	48
1.10 Γονιδιακή ενίσχυση και ανθεκτικότητα σε αντικαρκινικά φάρμακα	50
2. Σκοπός	52

3. Υλικά και Μέθοδοι	54
3.1 Φυσιολογία και Γενετική του σχιζοσακχαρομύκητα <i>S. Pombe</i>	54
3.1.1 Ονοματολογία γονιδίων και πρωτεϊνών.....	54
3.1.2 Καλλιέργεια του <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	54
3.1.3 Κατασκευή νέων στελεχών <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	57
Διασταύρωση στελεχών.....	58
Ανάλυση μειωτικών προϊόντων (Random Spore Analysis).....	58
Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S.pombe</i> με πλασμίδιο.....	58
Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S.pombe</i> με γονιδιωματική βιβλιοθήκη	60
3.1.4 Επαγωγή έκφρασης γονιδίων κάτω από των έλεγχο του nmt υποκινητή.....	61
3.1.5 Ανάλυση περιεχομένου DNA με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	62
3.1.6 Ενζυμική λύση κυτταρικού τοιχώματος κυττάρων <i>S.pombe</i>	62
3.2 Μοριακές Τεχνικές.....	64
3.2.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων	64
3.2.2 Κατασκευή πλασμιδίων υπερέκφρασης.....	64
3.2.3 Αντίδραση ανασυνδυασμού LR.....	66
3.2.4 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων <i>Stbl3</i>	66
3.2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>DH5a</i> library efficiency.....	67
3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Minipreps).....	68
3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midipreps)	69
3.2.8 Απομόνωση πλαμιδίων από κύτταρα <i>S. Pombe</i>	69
3.2.9 Κατάτμηση τμημάτων DNA	70
3.2.10 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα <i>S.pombe</i>	70
3.2.11 Real-time PCR	71
3.3 Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας.....	73
3.3.1 Μονιμοποίηση κυττάρων και χρώση πυρήνων με Hoechst.....	73
3.3.2 Απεικόνιση κυττάρων και ανάλυση εικόνας.....	73

3.3.3	Μέτρα ετερογένειας κυτταρικών πληθυσμών	75
	Ασυμμετρία ή λοξότητα (Skewness)	75
	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Interquantile range, IQR)	76
	Συντελεστής διακύμανσης ή μεταβλητότητας (Coefficient of variation, CV)	77
3.4	Αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων	77
3.4.1	Διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων	78
3.4.2	Ενίσχυση πλήρους γονιδιώματος (Whole Genome Amplification, WGA)	78
3.4.2.1	Μέθοδοι WGA που βασίζονται στην PCR	78
	Ενίσχυση γονιδιώματος με τη μέθοδο GenomePlex	80
3.4.2.2	Μέθοδοι WGA που βασίζονται σε ισοθερμική ενίσχυση	83
	Ενίσχυση γονιδιώματος με τη μέθοδο REPLI-g	84
	Ενίσχυση γονιδιώματος με τη μέθοδο TruePrime	85
3.5	Ανάλυση καρκινικών δεδομένων της TCGA	88
3.5.1	Λήψη δεδομένων	88
	Δεδομένα έκφρασης «RNA Seq V2 RSEM»	91
	Δεδομένα CNA «Putative copy-number alterations from GISTIC»	92
3.5.2	Κατηγοριοποίηση δειγμάτων με βάση την έκφραση πρωτεϊνών και επιπέδων γονιδιακής ενίσχυσης.	93
3.5.3	Υπολογισμός δείκτη συνολικής γονιδιακής ενίσχυσης (total amplification score)	94
4.	Αποτελέσματα	100
4.1	Μελέτη του φαινομένου της επαναντιγραφής του DNA στον σχιζοσακχαρομύκητα <i>S.pombe</i>	100
4.1.1	Μελέτη της επαναντιγραφής συγκεκριμένων περιοχών σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων	100
4.1.1.1	Οπτικοποίηση του περιεχόμενου DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων	103

4.1.1.2 Η επαναντιγραφή του DNA εμφανίζει ετερογένεια σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων	107
Γενετικός τόπος <i>lys1</i>	107
Γενετικός τόπος <i>ade3</i>	112
4.1.2 Μελέτη της επαναντιγραφής σε επίπεδο κυττάρων με αλληλούχηση ολόκληρου γονιδιώματος.....	116
4.1.2.1 Σύγκριση διαφορετικών μεθοδολογιών για την ενίσχυση γονιδιώματος	119
REPLI-g Single-cell WGA (Qiagen)	120
TruePrime Single-cell WGA (SYGNIS).....	123
GenomePlex WGA (Sigma-Aldrich)	126
4.1.3 Διερεύνηση της ρύθμισης της επαναντιγραφής των τελομερών ..	128
4.1.3.1 Σχετική ποσοτικοποίηση των υποτελομερικών περιοχών με real-time qPCR.....	130
4.1.3.2 Διερεύνηση πιθανού ρόλου των πρωτεϊνών Rif1 και Taz1	133
Rif1	134
Taz1	138
4.1.4 Διερεύνηση του μηχανισμού πρόκλησης επαναντιγραφής.....	140
4.2 Μελέτη της γονιδιακής ενίσχυσης σε καρκινικά δείγματα ασθενών του TCGA 146	
4.2.1 Μελέτη του ρόλου της επαναντιγραφής στην εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με καρκίνο	148
4.2.1.1 Υψηλή έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης μεμονωμένων γενετικών τόπων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.....	148
4.2.1.2 Υψηλή έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης μεμονωμένων γενετικών τόπων σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου.....	152
4.2.1.3 Υψηλή έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου.....	154

4.2.1.4	Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Cdt1/Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης είναι ανεξάρτητη της κατάστασης πολλαπλασιασμού	158
4.2.1.5	Η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης του ERBB2 υφίσταται παρουσία λειτουργικού p53.....	162
4.2.1.6	Η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης του ERBB2 παρατηρείται σε δείγματα με χαμηλή έκφραση της κυκλίνης A	164
4.2.2	Μελέτη του ρόλου των μηχανισμών ανίχνευσης βλάβης στην γονιδιακή ενίσχυση παρουσία επαναντιγραφής.....	167
4.2.3	Μελέτη του ρόλου των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στη γονιδιακή ενίσχυση παρουσία επαναντιγραφής.....	169
4.2.4	Μελέτη προτύπων γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού	172
5.	Συζήτηση	174
5.1	Μελέτη της επαναντιγραφής του DNA στον <i>S.pombe</i>	174
5.1.1	Μελέτη επαναντιγραφής του DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων <i>S.pombe</i>	174
5.1.2	Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της επαναντιγραφής των τελομερών	178
5.1.3	Μελέτη του μηχανισμού πρόκλησης επαναντιγραφής στον <i>S.pombe</i>	181
5.2	Επαναντιγραφή DNA και γονιδιακή ενίσχυση στον καρκίνο	183
5.2.1	Συσχέτιση του φαινομένου της επαναντιγραφής με τη γονιδιακή ενίσχυση σε καρκινικά δείγματα ασθενών.....	184
5.2.2	Η γονιδιακή ενίσχυση των δειγμάτων με αυξημένα επίπεδα Cdt1 και Cdc6 είναι ανεξάρτητη από την πολλαπλασιαστική ικανότητά τους...	185
5.2.3	Η λειτουργικότητα του παράγοντα p53 επηρεάζει τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης	186
5.2.4	Η έκφραση της κυκλίνης A2 επηρεάζει τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης του γενετικού τόπου ERBB2. .	187

5.2.5	Συμβολή των μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης της βλάβης στη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 και των επιπέδων ενίσχυσης.....	188
5.2.6	Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Cdt1 συσχετίζονται με συγκεκριμένα προφίλ γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος.	190
6.	Βιβλιογραφία	192

Περίληψη

Η αντιγραφή του DNA αποτελεί μια από τις θεμελιώδεις διεργασίες του κυττάρου μέσω της οποίας τα κύτταρα εξασφαλίζουν τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στους απογόνους τους. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η εκκίνηση της αντιγραφής συμβαίνει σε πολλαπλά σημεία διάσπαρτα στο γονιδίωμα που ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου και υπόκειται σε αυστηρή χωρική και χρονική ρύθμιση έτσι ώστε να επιτευχθεί ο πιστός και πλήρης διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος μέσα στα χρονικά περιθώρια της φάσης S. Απώλεια της ρύθμισης της αντιγραφής οδηγεί σε επαναντιγραφή του DNA και γονιδιωματική αστάθεια.

Στον *Schizosaccharomyces pombe* η υπερέκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα Cdc18/Cdc6 είναι ικανή για την επαγωγή επαναντιγραφής του DNA. Η επαναντιγραφή που παρατηρείται δεν είναι ομοιόμορφη κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, αντιθέτως συγκεκριμένες περιοχές τείνουν να υπερδιπλασιάζονται. Η απορρύθμιση του μηχανισμού αδειοδότησης επαρκεί για να προκαλέσει επαναντιγραφή και σε κύτταρα θηλαστικών και έχει συσχετιστεί με την κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων και τη γονιδιωματική αστάθεια. Οι βλάβες που δημιουργούνται στο DNA κατά τη διαδικασία της επαναντιγραφής ενεργοποιούν ειδικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που έχουν ως στόχο την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Έχει προταθεί ότι η επίλυση των βλαβών που δημιουργούνται κατά την επαναντιγραφή μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιακή ενίσχυση των υπερδιπλασιασμένων περιοχών. Η γονιδιακή ενίσχυση αποτελεί μια μορφή γονιδιωματικής αστάθειας που παρατηρείται συχνά στον καρκίνο. Αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό ενεργοποίησης ογκογονιδίων αλλά και εμφάνισης ανθεκτικότητας των κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα, συμβάλλοντας έτσι και στην επαγωγή της καρκινογένεσης αλλά και στη διατήρηση και εξέλιξη της νόσου.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην επαναντιγραφή του DNA καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε μελέτη της ετερογένειας του φαινομένου στον οργανισμό *S.pombe*. Επιπλέον, μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των φαινομένων της επαναντιγραφής και της γονιδιακής ενίσχυσης. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με δεδομένα υψηλής απόδοσης που αφορούν σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου. Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση της γονιδιακής ενίσχυσης με μονοπάτια απόκρισης στη βλάβη αλλά και με βασικά μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA.

Abstract

DNA replication is a fundamental cellular process through which the cells propagate their genetic information. In eukaryotes, replication initiates from hundreds of sites scattered across the genome called origins of replication. This process takes place during S phase of the cell cycle and is tightly regulated in both time and space in order to ensure precise duplication of the entire genome within this limited time frame. Deregulation of the initiation process results in multiple rounds of replication, called re-replication which is closely connected to genomic instability.

It has been shown that in *Schizosaccharomyces pombe* overexpression of the licensing factor Cdc18/Cdc6 is adequate to promote uneven re-replication. This means that the copy number across the genome is not the same and that certain regions appear to be significantly over-replicated. Deregulation of the licensing process can also lead to re-replication in mammalian cells thus promoting tumorigenesis. DNA damage that occurs during re-replication triggers checkpoint activation resulting in pausing the cell cycle progression and activation DNA damage repair pathways. The repair of DNA damage that is caused by re-replication is considered to result in amplification of the re-replicated regions. Gene amplification is a common form of genomic instability in cancer. It is implicated in activation of oncogenes and in drug resistance.

This study focuses on investigating the molecular mechanism that leads to DNA re-replication, as well as the heterogeneity of the phenomenon in *S.pombe*. Moreover, we aimed to study the correlation between re-replication and gene amplification in samples from cancer patients, as well as reveal a potential implication of DNA damage response and repair pathways in this process.

1. Εισαγωγή

1.1 Η αντιγραφή του DNA

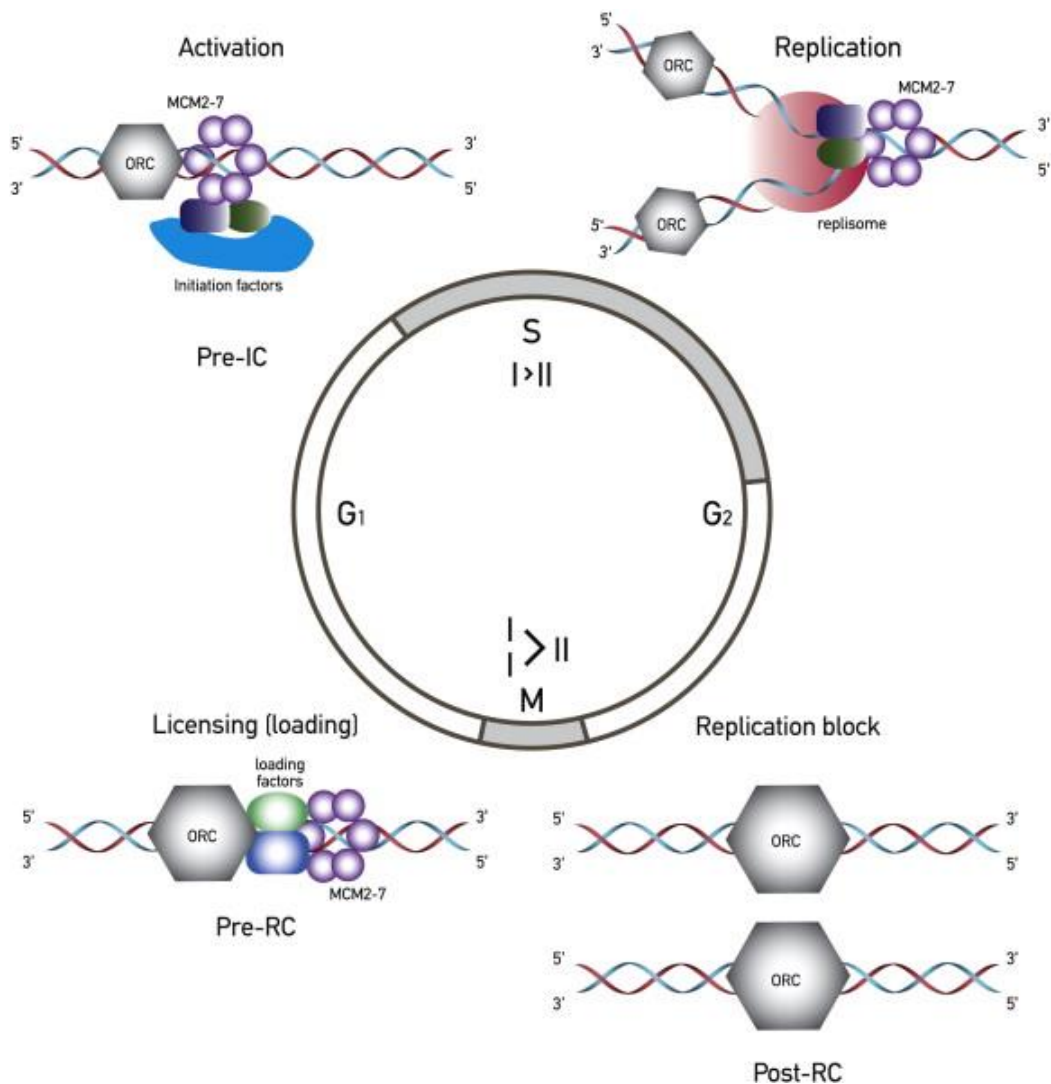
Η αντιγραφή του DNA αποτελεί μια θεμελιώδη διαδικασία του κυττάρου απαραίτητη για τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στους κυτταρικούς απογόνους, η οποία λαμβάνει χώρα κατά τη φάση σύνθεσης S του κυτταρικού κύκλου. Προκειμένου να επιτευχθεί ο πιστός διπλασιασμός του γονιδιώματος μέσα στα χρονικά περιθώρια της S φάσης, η διαδικασία της αντιγραφής υπόκειται σε αυστηρή χωρική και χρονική ρύθμιση. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η έναρξη της αντιγραφής συμβαίνει σε εκατοντάδες σημεία κατά μήκος των χρωμοσωμάτων που ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής (ή αφετηρίες). Στον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* καθώς και στον σχιζοσακχαρομύκητα *S.pombe* ο αριθμός των αφετηριών υπολογίζεται περίπου στις 500, ενώ γονιδιώματα ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα του ανθρώπου μπορεί να περιλαμβάνουν ως και 50.000 θέσεις έναρξης [1, 2]. Σε κάθε κυτταρικό κύκλο, ωστόσο χρησιμοποιείται ένα μέρος των συνολικών θέσεων έναρξης της αντιγραφής, ενώ πολλές από αυτές αντιγράφονται παθητικά καθώς τις διαπερνά κάποια αντιγραφική διχάλα προερχόμενη από γειτονική αφετηρία. Η αφθονία των αφετηριών κατά μήκος των χρωμοσωμάτων εξασφαλίζει την έγκαιρη και πλήρη αντιγραφή των μεγάλων γονιδιωμάτων που διαθέτουν κατά τη διάρκεια της S φάσης. Εκτός από τον μεγάλο αριθμό αφετηριών τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά από ρυθμιστικούς μηχανισμούς που οργανώνουν την έναρξη της αντιγραφής έτσι ώστε η πυροδότηση της κάθε θέσης έναρξης να συμβεί μία και μόνο φορά κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης και να διασφαλιστεί ότι όλες οι περιοχές του γονιδιώματος θα διπλασιαστούν. Η απορρύθμιση αυτών των μηχανισμών οδηγεί σε γονιδιωματική αστάθεια με πιθανά καταστροφικές συνέπειες για τα κύτταρα.

1.1.1 Έναρξη της αντιγραφής του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα

Παρά τις διαφορές που παρουσιάζουν τα γονιδιώματα, σε σχέση με το μέγεθος και την πολυπλοκότητά τους, όσο προχωράμε από τους μύκητες προς τον άνθρωπο, ο κύριος μηχανισμός της έναρξης της αντιγραφής είναι συντηρημένος και απαρτίζεται

από δύο διακριτά βήματα. Το πρώτο βήμα, αποτελεί την αδειοδότηση της αντιγραφής και περιλαμβάνει την αναγνώριση των αφετηριών από το σύμπλοκο αναγνώρισης ORC (Origin Recognition Complex) και τη δημιουργία του προ-αντιγραφικού συμπλόκου pre-RC (pre-replicative complex) με τη στρατολόγηση επιπλέον αδειοδοτικών παραγόντων. Κατά το δεύτερο βήμα λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση του προ-αντιγραφικού συμπλόκου με αποτέλεσμα το ξετύλιγμα της διπλής έλικας και την πυροδότηση της αφετηρίας [3].

Το σύμπλοκο αναγνώρισης ORC αποτελεί ένα συντηρημένο ετεροεξαμερές πρωτεϊνών το οποίο προσδένεται σε όλες τις πιθανές θέσεις έναρξης της αντιγραφής. Στη φάση αυτή το σύμπλοκο έχει τη μορφή ανοιχτού δακτυλίου που περικλείει το DNA [4-6]. Από το τέλος της μίτωσης και κατά τη διάρκεια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου η πρωτεΐνη Cdc6, που διαθέτει ενεργότητα υδρόλυσης ATP (ATPase), προσδένεται στα σύμπλοκα ORC που βρίσκονται στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του συμπλόκου ORC και το κλείσιμο του δακτυλίου γύρω από το DNA [7-9]. Στη συνέχεια, αυτή η δομική αλλαγή επιτρέπει τη στρατολόγηση του αδειοδοτικού παράγοντα Cdt1 καθώς και ενός διπλού συμπλόκου MCM ελικασών στην ανενεργή τους μορφή σχηματίζοντας έτσι το προ-αντιγραφικό σύμπλοκο (Pre-RC) [9-11].



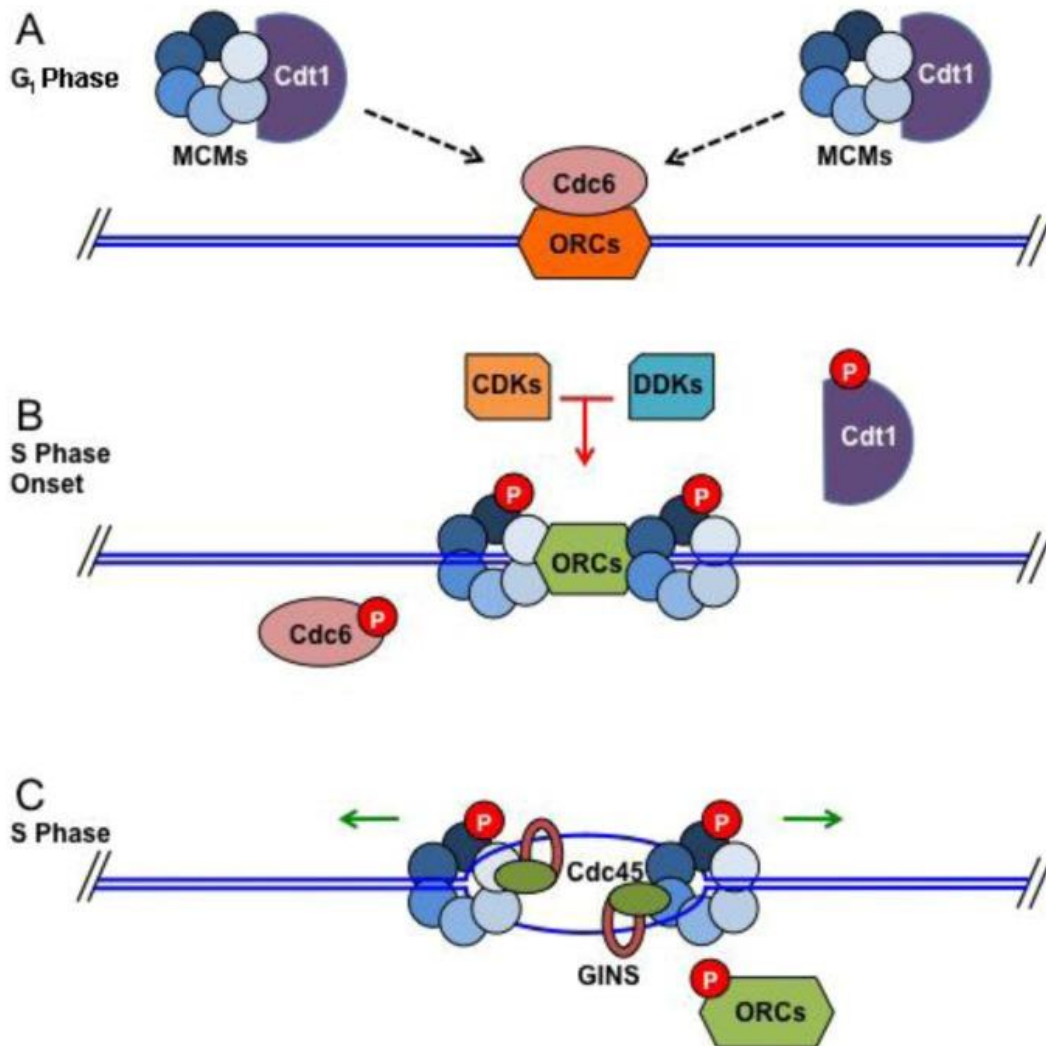
Εικόνα 1.1 Ρύθμιση της αντιγραφής του DNA κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η αναγνώριση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής γίνεται με άμεση πρόσδεση των συμπλόκων ORC καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στο τέλος της μίτωσης και κατά τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου το σύμπλοκο των ελικάσων MCM προσδένεται στις αφετηρίες με τη βοήθεια επιπλέον παραγόντων δημιουργώντας το προ-αντιγραφικό σύμπλοκο (pre-RC), με αποτέλεσμα την αδειοδότηση των αφετηριών. Με τη μετάβαση από την G1 στην S φάση, λαμβάνει χώρα η στρατολόγηση επιπλέον παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του προ-εναρκτήριου συμπλόκου (pre-IC). Ακολουθεί η συναρμολόγηση της αντιγραφικής μηχανής και η έναρξη της αντιγραφής του DNA. Μετά την έναρξη της S φάσης η διαδικασία αδειοδότησης καταστέλλεται, εμποδίζοντας πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου [3].

Προκειμένου να επιτευχθεί η φόρτωση του διπλού συμπλόκου των MCM, αρχικά το πρώτο εξάμερές Mcm2-7 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Cdt1 και στρατολογείται στο DNA μέσα από την αλληλεπίδρασή τους με το σύμπλοκο ORC-Cdc6 [12, 13]. Η πρόσδεση αυτή ακολουθείται από απελευθέρωση των Cdt1 και Cdc6. Στη συνέχεια

ένα δεύτερο μόριο Cdc6 προσδένεται μαζί με ένα σύμπλοκο Cdt1-Mcm2-7 στο ήδη υπάρχον σύμπλοκο ORC-Mcm2-7, ενώ ακολουθεί απελευθέρωση των Cdc6, Cdt1 και ORC [14]. Τα εξαμερή των MCM αρχικά έχουν τη μορφή ανοιχτού δακτυλίου διατηρώντας ένα κενό μεταξύ των Mcm2 και Mcm5 [15-17]. Το Cdt1 λειτουργεί ως σαπερόνη σταθεροποιώντας τη δομή αυτή. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου εισέρχεται το δίκλωνο DNA μέσα από τον δακτύλιο των MCM δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Έρευνες υποστηρίζουν ότι το κενό μεταξύ Mcm2-Mcm5 δεν είναι αρκετά πλατύ ώστε να εισέλθει το δίκλωνο DNA και ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ORC-Cdc6 και Cdt1-Mcm2-7 είναι απαραίτητες για τη διεύρυνσή του και την επακόλουθη φόρτωση των MCM [17]. Ένα εναλλακτικό μοντέλο υποστηρίζει ότι κατά την πρόσδεση του Cdt1 στο εξαμερές Mcm2-7 γίνεται διεύρυνση του κενού μεταξύ Mcm2/Mcm5 επιτρέποντας τη διέλευση του δίκλωνου DNA. Μετά την πρόσδεση του Cdt1-Mcm2-7 στο σύμπλοκο ORC-Cdc6, το κενό Mcm2/Mcm5 δεν είναι τόσο ευρύ, υποστηρίζοντας ότι το σύμπλοκο ORC μπορεί να παίζει ρόλο στο κλείσιμο του δακτυλίου MCM και όχι στο άνοιγμα [18]. Η απελευθέρωση των Cdt1 και Cdc6 κατά τη φόρτωση των του διπλού συμπλόκου MCM κλείνει περαιτέρω το κενό των δακτυλίων εγκλωβίζοντας το δίκλωνο DNA στο εσωτερικό [19]. Ωστόσο, Στο στάδιο αυτό το σύμπλοκο δεν είναι λειτουργικό και απαιτείται ενεργοποίηση του κατά τη μετάβαση από το φάση G1 στην S.

Μετά τη φόρτωση των MCM, ακολουθεί η διαδικασία της ενεργοποίησης του προ-αντιγραφικού και η δημιουργία προ-εναρκτήριου συμπλόκου, pre-IC (pre-Initiation Complex). Η ενεργοποίηση συμβαίνει μεμονωμένα σε κάθε αφετηρία και η χρονική στιγμή ενεργοποίησης ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα. Κύριο ρόλο στη διαδικασία παίζουν η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση CDK και η Dbf4-εξαρτώμενη κινάση DDK. Αρχικά, η CDK φωσφορυλιώνει τους παράγοντες Sld2 και Sld3, γεγονός που πυροδοτεί την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Dpb11 με το σύμπλοκο Mcm2-7 [20-22]. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του Sld3 οδηγεί στην φωσφορυλίωση των Mcm2, Mcm4 και Mcm6 από την DDK [23-25]. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές επιτρέπουν το άνοιγμα του δακτυλίου MCM επιτρέποντας τη εκτόπιση του μονόκλωνου DNA [26]. Τέλος, η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Sld3 στρατολογεί επιπλέον παράγοντες όπως το Cdc45 και τους παράγοντες GINS στο σύμπλοκο των ελικάσων. Η στρατολόγηση συμβαίνει στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των Mcm2/Mcm5 εμποδίζοντας έτσι την απελευθέρωση του μονόκλωνου DNA από το κέντρο του δακτυλίου των MCM [27, 28]. Η απομάκρυνση των Sld2, Sld3 και Dpb11 που ακολουθεί, οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου CMG (Cdc45/Mcm2-7/GINS).

Ακολουθεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης Mcm10 [29-33] στο σύμπλοκο CMG η οποία σταθεροποιεί την πρόσδεση των Cdc45 και GINS στους δακτυλίους των MCM και προκαλεί αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του συμπλόκου η οποία ενεργοποιεί το ξεδίπλωμα του DNA [31].



Εικόνα 1.2 Η έναρξη της αντιγραφής του DNA πραγματοποιείται σε πολλαπλά στάδια. Μετά την αναγνώριση των αφετηριών από το σύμπλοκο ORC, συγκροτείται σταδιακά το διπλό σύμπλοκο των MCM ελικάσων. (A) Η φόρτωση των MCM γύρω από το δίκλωνο DNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια των αδειοδοτικών παραγόντων Cdc6 και Cdt1, των οποίων η συνδυασμένη δράση συμβάλλει στο άνοιγμα και κλείσιμο του δακτυλίου των MCM ώστε να διέλθει το δίκλωνο DNA. (B) Η δράση των κινασών CDK/DDK ελέγχει την ενεργοποίηση του προ-εναρκτήριου συμπλόκου και την έναρξη της αντιγραφής του DNA. Οι παράγοντες Cdt1 και Cdc6 απομακρύνονται από τον πυρήνα και αποικοδομούνται. (C) Το σύμπλοκο των MCM μαζί με τους παράγοντες GINS και Cdc45 πραγματοποιούν το ξεδίπλωμα της διπλής έλικας έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η συναρμολόγηση της αντιγραφικής μηχανής και να ξεκινήσει η διαδικασία της σύνθεσης [34].

1.2 Χρονική ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής

Η πυροδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής αποτελεί μια στοχαστική διαδικασία. Σε κάθε κυτταρικό κύκλο μόνο ένα υποσύνολο των αδειοδοτημένων αφετηριών θα ενεργοποιηθούν τελικά. Η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από δύο βασικές ιδιότητες των αφετηριών: το χρόνο ενεργοποίησής τους (timing) και την απόδοσή τους (efficiency). Ο χρόνος ενεργοποίησης αναφέρεται στην χρονική περίοδο της S φάσης του κυτταρικού κύκλου κατά την οποία συμβαίνει η πυροδότηση. Ως απόδοση ορίζεται το ποσοστό των κυτταρικών κύκλων στους οποίους μια δεδομένη αφετηρία ενεργοποιείται. Στους μύκητες η απόδοση των αφετηριών εμφανίζει μεγάλο εύρος, με τιμές που κυμαίνονται από ~0% μέχρι περίπου 80% [35]. Αντίθετα στα μετάζωα η απόδοση των αφετηριών είναι σημαντικά μειωμένη. Συχνά η απόδοση και ο χρόνος ενεργοποίησης των αφετηριών σχετίζονται. Συγκεκριμένα οι αποδοτικές αφετηρίες τείνουν να ενεργοποιούνται νωρίτερα κατά τη φάση S, ενώ εκείνες που ενεργοποιούνται αργότερα, χαρακτηρίζονται από μειωμένη απόδοση και συχνά αντιγράφονται παθητικά από διχάλες αντιγραφής προερχόμενες από γειτονικές αφετηρίες [36]. Η ανάλυση των προφίλ αντιγραφής σε κύτταρα θηλαστικών έδειξε ότι τα γονιδιώματα τους οργανώνονται σε μεγάλες περιοχές με παρόμοιο χρόνο ενεργοποίησης που ονομάζονται CTRs (constant-timing regions) [37]. Στους μύκητες δεν υπάρχει τέτοιου τύπου οργάνωση του γονιδιώματος.

Η χρονική ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής του DNA επιτυγχάνεται με τη συμβολή πολλαπλών μηχανισμών. Οι κύριοι παράγοντες που φέρονται να παίζουν ρόλο στην εγκαθίδρυση του χρονικού προγράμματος της αντιγραφής είναι το χρωματινικό περιβάλλον, η τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος στον πυρήνα καθώς και η λειτουργία πολλαπλών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν είτε ενεργοποιητικά είτε κατασταλτικά στην πυροδότηση των αφετηριών.

1.2.1 Χρωματινικό περιβάλλον και χρωμοσωμική θέση

Πολλές έρευνες υποστηρίζουν ότι το χρωματινικό περιβάλλον παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του προγράμματος της αντιγραφής τόσο στους μύκητες όσο και στα μετάζωα. Η κατάσταση της χρωματίνης φαίνεται να επηρεάζει τόσο τη δημιουργία του προ εναρκτήριου συμπλόκου όσο και την πρόσβαση και στρατολόγηση των παραγόντων έναρξης με αποτέλεσμα τη χρονική ρύθμιση της πυροδότησης των

αφετηριών [38]. Οι θέσεις έναρξης της αντιγραφής βρίσκονται συνήθως σε περιοχές που δεν έχουν νουκλεοσώματα (nucleosome free regions, NFR) [39]. Στον *S.cerevisiae* έχει δειχθεί ότι η οργάνωση των νουκλεοσωμάτων γύρω από την περιοχή των αφετηριών κατά τη φάση G1 διαφοροποιείται κατά μήκος του γονιδιώματος, ενώ φαίνεται να σχετίζεται με την απόδοση και το χρόνο ενεργοποίησης των αφετηριών [40, 41].

Η ενεργοποίηση νωρίς κατά τη φάση S συνήθως συμβαίνει σε αφετηρίες που βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές των γονιδιωμάτων που περιέχουν μεταγραφόμενα γονίδια και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστονών όπως H3K4me, H3K36me₃ και ακετυλίωση των H3 και H4 [42, 43]. Αντιθέτως οι αφετηρίες που βρίσκονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές που καταλαμβάνονται από H3K9me, H3K27me και υποακετυλιωμένες μορφές των H3 και H4 ιστονών τείνουν να ενεργοποιούνται αργότερα κατά τη φάση S [44]. Έτσι λοιπόν σε γενικές γραμμές, η ενεργοποίηση της αντιγραφής ξεκινά στην αρχή της S στις ευχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος, συνεχίζει με την ετεροχρωματίνη των κεντροσωμάτων και τέλος ενεργοποιείται και στη συμπαγή ετεροχρωματίνη των τελομερικών περιοχών. Στους μύκητες ωστόσο, υπάρχουν επιπλέον μηχανισμοί που εξασφαλίζουν την πρώιμη ενεργοποίηση των αφετηριών κοντά στις περιοχές των κεντρομερών [45]. Για παράδειγμα, στον *S.pombe* η πρωτεΐνη Swi6 ρυθμίζει την πυροδότηση αφετηριών γύρω από τα κεντρομερή νωρίς κατά τη φάση S, προσδένοντας άμεσα στις περιοχές αυτές και στρατολογώντας την πρωτεΐνη Dfp1 που είναι η ομόλογη της ενεργοποιητικής υπομονάδας Dbf4 της DDK [46]. Μέσω της άμεσης στρατολόγησης της DDK στις περιοχές των κεντρομερών, επιτυγχάνεται η πρώιμη ενεργοποίηση των αφετηριών οι οποίες υπό άλλες συνθήκες θα ενεργοποιούνταν σε μετέπειτα στάδια της S.

1.2.2 Πρωτεΐνες ρυθμιστές του προγράμματος αντιγραφής

Τα τελευταία χρόνια πολλοί πρωτεϊνικοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί οι οποίοι συμβάλλουν στη ρύθμιση του προγράμματος της αντιγραφής. Για παράδειγμα στον *S.cerevisiae*, οι μεταγραφικοί παράγοντες Fkh1 και Fkh2 ρυθμίζουν χρονικά μια πληθώρα αφετηριών κατά μήκος του γονιδιώματος [47, 48]. Απαλοιφή των Fkh1/Fkh2 προκαλεί σημαντικές διαφορές στο πρόγραμμα της αντιγραφής, ενώ

παρατηρήθηκε ότι οι εν λόγω παράγοντες ρυθμίζουν είτε θετικά είτε αρνητικά την ενεργοποίηση των αφετηριών. Ειδικές θέσεις πρόσδεσης υπάρχουν στην περιοχή γύρω από τις αφετηρίες που ενεργοποιούνται από τους παράγοντες Fkh, υποδηλώνοντας ότι δρουν *in cis* για να προάγουν την πυροδότηση [47]. Επιπλέον, η υπερέκφραση τους διαταράσσει το πρόγραμμα αντιγραφής, ενώ πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η παρουσία τους είναι αναγκαία για τη στρατολόγηση της Dbf4 υπομονάδας της DDK έτσι ώστε να πυροδοτήσει την έναρξη της αντιγραφής νωρίς κατά τη φάση S [49].

Επιπλέον παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί ως αρνητικοί ρυθμιστές της έναρξης της αντιγραφής. Στον *S.pombe* οι πρωτεΐνες Rif1 και Taz1 παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του προγράμματος της αντιγραφής [50, 51]. Το Taz1 αποτελεί το ομόλογο των πρωτεϊνών του ανθρώπου TRF1 και TRF2. Παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής πολλών αφετηριών, κυρίως σε αυτές που βρίσκονται στις παρακείμενες των τελομερών περιοχές. Ο παράγοντας Taz1 δρα μέσω άμεσης πρόσδεσης σε περιοχές κοντά στις αφετηρίες όπου παρεμποδίζει την στρατολόγηση απαραίτητων για την πυροδότηση παραγόντων όπως το Sld3 [51]. Ο παράγοντας Rif1 έχει δείχθει ότι μπορεί να ρυθμίζει τόσο θετικά όσο και αρνητικά την ενεργοποίηση θέσεων έναρξης της αντιγραφής [50]. Στον *S.pombe* το Rif1 προσδένεται στην περιοχή των τελομερών, των κεντρομερών αλλά και σε εσωτερικές θέσεις πάνω στα χρωμοσώματα. Στις περιοχές κοντά στα τελομερή (υποτελομερικές περιοχές) το Rif1 προσδένεται μέσω της αλληλεπίδρασής του με το Taz1 καταστέλλοντας τις παρακείμενες θέσεις έναρξης. Στις υπόλοιπες θέσεις, πλην των τελομερών, το Rif1 προσδένεται ανεξάρτητα από το Taz1 και δρα είτε ενεργοποιητικά, είτε κατασταλτικά για την πυροδότηση των αφετηριών ρυθμίζοντας την στρατολόγηση του παράγοντα Cdc45. Απαλοιφή του Rif1 σε κύτταρα *S.pombe* προκαλεί την καθυστέρηση της ενεργοποίησης θέσεων έναρξης της αντιγραφής στην περιοχή γύρω από τα κεντρομερή. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι στο *S.cerevisiae*, στο *X.laenvis* καθώς και σε κύτταρα ανθρώπου, το Rif1 ρυθμίζει το πρόγραμμα της αντιγραφής μέσω της στρατολόγησης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP1 η οποία οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση του συμπλόκου MCM στην αρχή της G1 φάσης [52-56].

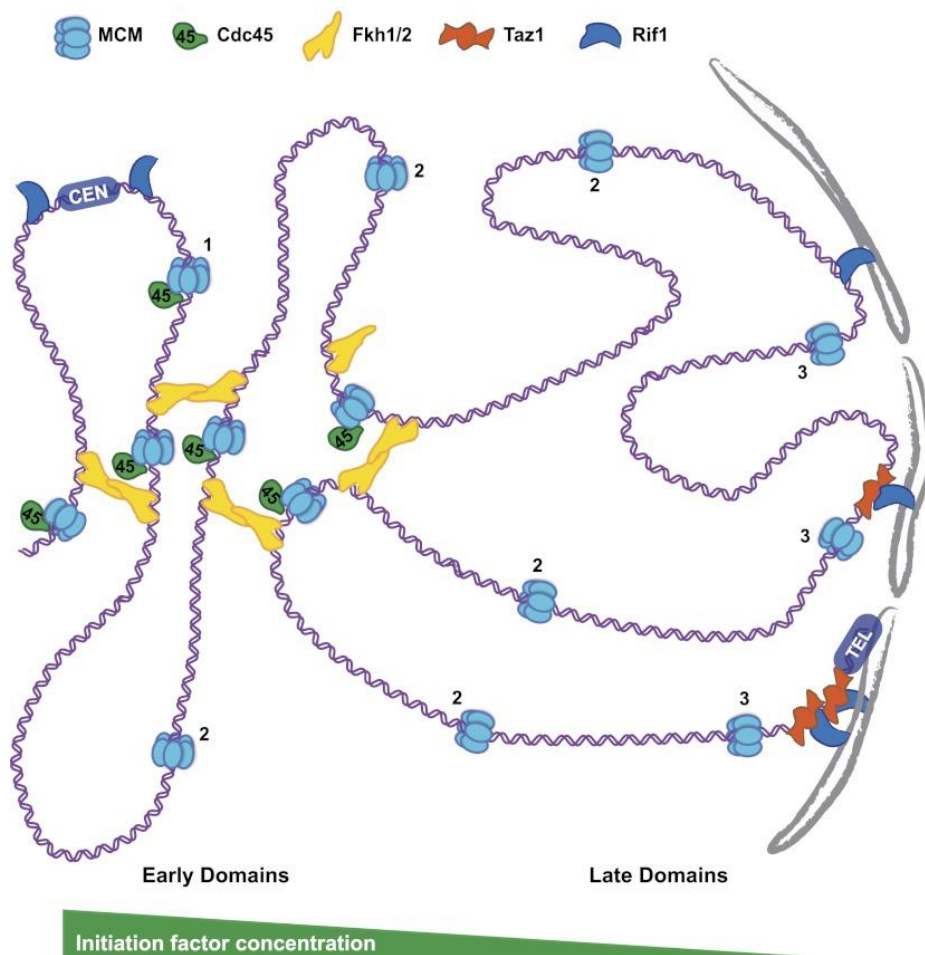
1.2.3 Χρονική ρύθμιση αντιγραφής μέσω ανταγωνισμού

Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων έναρξης είναι περιορισμένα και έχει προταθεί ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των θέσεων έναρξης για τους παράγοντες αυτούς παίζει σημαντικό ρόλο στη χρονική ρύθμιση της αντιγραφής. Το Cdc45 αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα περιοριστικού παράγοντα καθώς έχει δειχθεί ότι ο χρόνος ενεργοποίησης και η απόδοση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα πρόσδεσης του Cdc45 σε αυτές [57]. Γενικά η υπερέκφραση παραγόντων που συμβάλουν στο σχηματισμό του προ-εναρκτήριου συμπλόκου όπως το Cdc45 ή το Hsk1-Dfp1 (ομόλογο των Cdc7-Dbf4 στον *S.pombe*), οδηγεί σε πρόωμη ενεργοποίηση των αφετηριών ανεξάρτητα από την απόδοσή τους [57, 58]. Στον *S.cerevisiae* τα επίπεδα των παραγόντων Sld2, Sld3, Dbf4 και Cdc45 είναι επίσης χαμηλά [59], ενώ η ταυτόχρονη υπερέκφραση των Sld3, Sld7 και Cdc45 οδηγεί σε ενεργοποίηση των αφετηριών νωρίτερα κατά τη φάση S [60]. Σε κύτταρα θηλαστικών επίσης το Cdc45 δρα ως περιοριστικός παράγοντας [61, 62]. Τέλος, η υπερέκφραση των περιοριστικών αυτών παραγόντων προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση των αφετηριών κατά μήκος του γονιδιώματος, οδηγώντας τελικά σε εξάντληση των dNTP αποθεμάτων του κυττάρου. Επιπλέον, η αύξηση των διαθέσιμων dNTPs στα κύτταρα επιταχύνει το πρόγραμμα της αντιγραφής, υποδηλώνοντας την παρουσία μηχανισμού που ρυθμίζει την πυροδότηση των αφετηριών σύμφωνα με τα αποθέματα του κυττάρου σε dNTP έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι η αντιγραφή θα ολοκληρωθεί χωρίς προβλήματα [63, 64].

1.2.4 Τρισδιάστατη οργάνωση του πυρήνα

Η οργάνωση του γονιδιώματος στον τρισδιάστατο χώρο του πυρήνα αποτελεί έναν ακόμα σημαντικό παράγοντα στη ρύθμιση του προγράμματος αντιγραφής τόσο στους μύκητες όσο και στα μετázωα. Στον *S.cerevisiae* οι αφετηρίες που ενεργοποιούνται αργότερα κατά την αντιγραφή, βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα κατά τη φάση G1. Έχει προταθεί ότι αυτή τη τοποθέτηση συμβάλει στη χρονική ρύθμιση των αφετηριών αυτών [65], ωστόσο η αγκυροβόληση αφετηριών στην περιφέρεια του πυρήνα φαίνεται ότι δεν επαρκεί για την καταστολή της πυροδότησης [66]. Στον *S.pombe* η αγκυροβόληση αφετηριών στον πυρηνικό φάκελο μπορεί να προκαλέσει

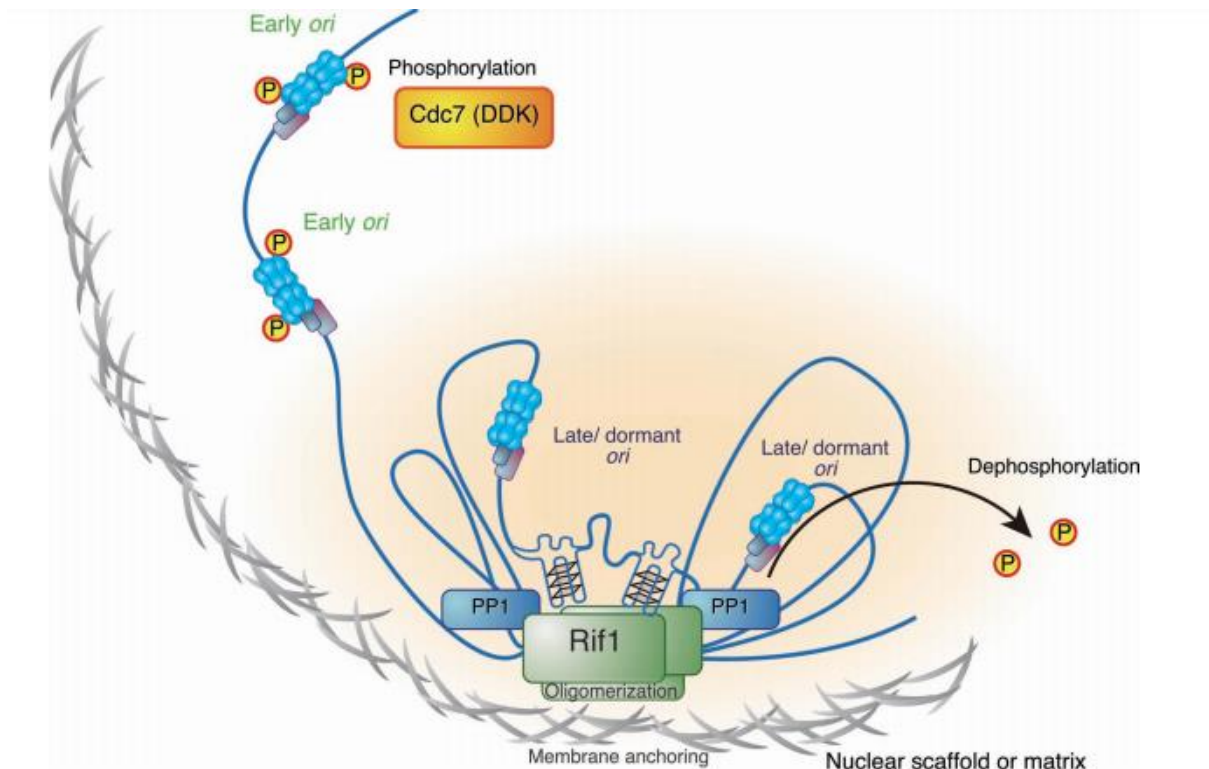
καθυστέρηση της πυροδότησης μόνο αν συνοδεύεται από σχηματισμό ετεροχρωματίνης στην ευρύτερη περιοχή [67]. Αντιθέτως, οι θέσεις έναρξης της αντιγραφής που ενεργοποιούνται στα πρώτα στάδια της S φαίνεται να ομαδοποιούνται κοντά στα κεντρομερή μέσω αλληλεπιδράσεων που διαμεσολαβούνται από τους παράγοντες Fkh1/2 [47, 68].



Εικόνα 1.3 Μοντέλο χρονικής ρύθμισης της αντιγραφής βασισμένο στην τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του γονιδιώματος και στη δημιουργία βαθμίδωσης περιοριστικών παραγόντων.

Κατά τη G1 οι μεταγραφικοί παράγοντες Fkh1/2 προσδένονται στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής ομαδοποιώντας τις σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση περιοριστικών παραγόντων όπως το Cdc45. Στα κεντρομερή η σύνδεση του Cdc45 με τις αφετηρίες πιθανά συμβαίνει μέσω του Rif1 (1). Στα τελομερή, το Rif1 προσδένεται μέσω τους Taz1 και οδηγεί στην αγκυροβόληση των αφετηριών στην περιφέρεια του πυρήνα (3), όπου η συγκέντρωση του Cdc45 είναι μειωμένη. Επιπλέον, η ετεροχρωματίνη που χαρακτηρίζει την περιοχή των τελομερών συμβάλλει περαιτέρω στη μειωμένη πρόσβαση του Cdc45 στις αφετηρίες. Θέσεις έναρξης που βρίσκονται σε ενδιάμεσες θέσεις (2) στον τρισδιάστατο χώρο είτε προσδένουν Cdc45 που έχει απελευθερωθεί από τις αφετηρίες που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί, είτε αντιγράφονται παθητικά από διερχόμενη αντιγραφική διχάλα [69].

Στα κύτταρα των θηλαστικών το πρόγραμμα της αντιγραφής οργανώνεται σε μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές που περιέχουν αφετηρίες με παρόμοιες ιδιότητες και ονομάζονται RDs (replication domains). Μελέτη της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος με τεχνικές όπως το Hi-C (Genome-wide chromatin conformation capture) έδειξε ότι η χρωματίνη οργανώνεται σε μικρότερες δομές που ονομάζονται τοπολογικά συνεκτικές περιοχές (topologically associated domains, TADs) που φαίνεται να αλληλεπικαλύπτονται με τα RDs [70, 71]. Η οργάνωση σε TADs συμβαίνει κατά την αρχή της φάσης G1 και συμπίπτει χρονικά με την εγκαθίδρυση του προγράμματος αντιγραφής [72]. Ωστόσο η τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος δεν αρκεί από μόνη της για τη διατήρηση του προγράμματος αντιγραφής και απαιτούνται επιπλέον παράγοντες. Η πρωτεΐνη Rif1 φαίνεται να αποτελεί τη σύνδεση μεταξύ της αρχιτεκτονικής του πυρήνα και του προγράμματος της αντιγραφής. Η λειτουργία του έχει σχετιστεί με την οργάνωση του πυρήνα μιας και έχειδειχθεί ότι η παρουσία του κατά τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των RDs [73]. Στον *S.pombe* το Rif1 προσδένεται σε αφετηρίες που βρίσκονται σε εσωτερικές θέσεις των χρωμοσωμάτων αναγνωρίζοντας άμεσα ειδικές αλληλουχίες πρόσδεσης (Rif1-BSs) που σχηματίζουν δομές όμοιες με G-quadruplex. Ολιγομερισμός των μορίων Rif1 που βρίσκονται αγκυροβολημένα στις θέσεις πρόσδεσης οδηγεί στη δημιουργία βρόγχων οι οποίοι συνδέονται με τη μεμβράνη του πυρήνα οδηγώντας στην καθυστέρηση της έναρξης της αντιγραφής [74].

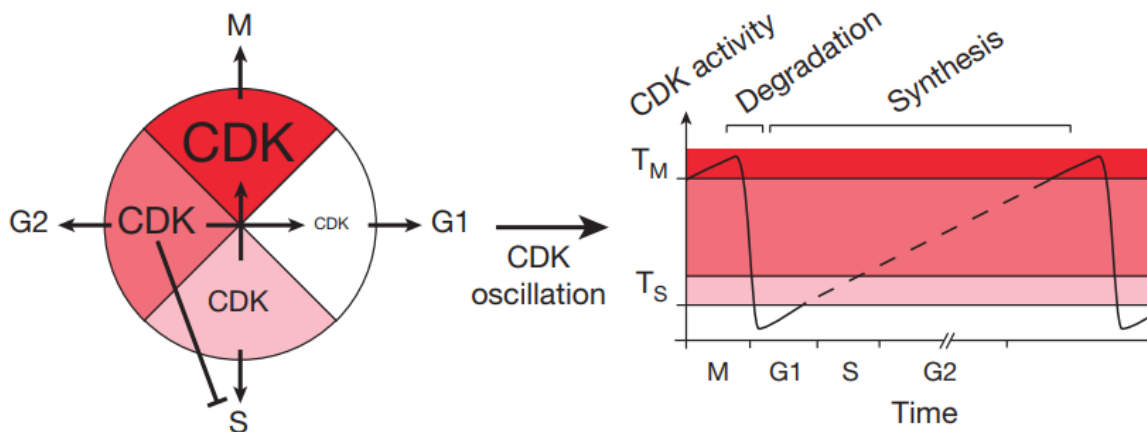


Εικόνα 1.4 Μοντέλο λειτουργίας της πρωτεΐνης Rif1 στον *S.pombe*. Το Rif1 προσδένεται στο γονιδίωμα αναγνωρίζοντας ειδικές θέσεις πρόσδεσης που σχηματίζουν δομές όμοιες με G-quadruplex. Η ομαδοποίηση των αφετηριών μέσω της πρόσδεσης του Rif1 δημιουργεί περιοχές κοντά στην περιφέρεια του πυρήνα που χαρακτηρίζονται από καταστολή της έναρξης της αντιγραφής. Η πρόσδεση του Rif1 στο DNA οδηγεί στην στρατολόγηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP1 η οποία αντιστρέφει τα γεγονότα φωσφορυλίωσης της DDK εμποδίζοντας την πυροδότηση των παρακείμενων θέσεων έναρξης της αντιγραφής [75].

1.3 Μηχανισμοί παρεμπόδισης της επαναντιγραφής

Προκειμένου ένα κύτταρο να δώσει δύο γενετικά πανομοιότυπους απογόνους θα πρέπει να διπλασιάσει πλήρως και μόνο μία φορά το γονιδίωμα του μέσα στα πλαίσια ενός κυτταρικού κύκλου. Ο σωστός διπλασιασμός του γονιδιώματος αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη δημιουργία φυσιολογικών απογόνων με ίδιο περιεχόμενο DNA και τα κύτταρα έχουν αναπτύξει πολλαπλούς μηχανισμούς ρύθμισης έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ομαλή έκβαση της διαδικασίας. Απορρύθμιση των μηχανισμών αυτών μπορεί να προκαλέσει μία σειρά από γεγονότα όπως αυξημένο περιεχόμενο DNA, πρόκληση βλαβών και ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης που τελικά οδηγούν σε γονιδιωματική αστάθεια.

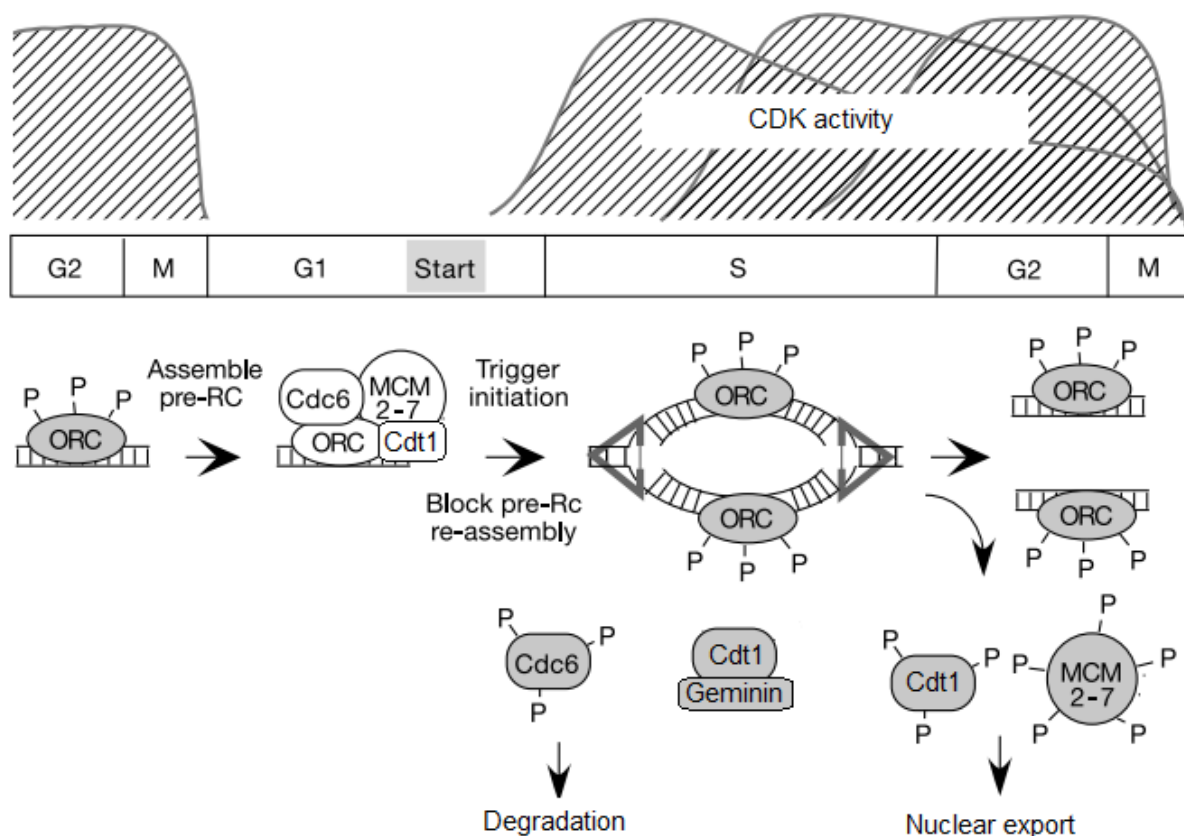
Είναι υψίστης σημασίας για ένα κύτταρο να αναγνωρίζει τις περιοχές του γονιδιώματος που έχουν ήδη αντιγραφεί ώστε να αποτρέψει την επαναπυροδότηση των αφετηριών που εμπεριέχονται σε αυτές. Η ενεργοποίηση των αφετηριών ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από την λειτουργία των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK) και μιας λιγάσης της ουβικουιτίνης που ονομάζεται σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης (Anaphase promoting complex, APC). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συναρμολόγηση των προ-αντιγραφικών συμπλόκων στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής είναι η χαμηλή ενεργότητα της CDK και υψηλή ενεργότητα του APC, που συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη μετάβαση από τη φάση της μίτωσης στη G1. Στη φάση αυτή η χαμηλή ενεργότητα της CDK δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση του προ-αντιγραφικού συμπλόκου εμποδίζοντας την έναρξη της αντιγραφής. Για την πυροδότηση των αφετηριών απαιτείται απενεργοποίηση του APC και υψηλή ενεργότητα CDK, συνθήκες που υπάρχουν κατά τη μετάβαση από την G1 φάση στην S. Παράλληλα η εκ νέου συναρμολόγηση προ-αντιγραφικών συμπλόκων στις αφετηρίες αποτρέπεται λόγω των υψηλών επιπέδων της CDK, τα οποία εξακολουθούν και αυξάνονται μέχρι την είσοδο στη μίτωση. Κατά το τέλος της μίτωσης τα επίπεδα της CDK πέφτουν και πάλι επιτρέποντας τη συναρμολόγηση των προ-αντιγραφικών συμπλόκων με την είσοδο του κυττάρου σε νέο κύκλο.



Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων της ενεργότητας CDK κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στον *S.pombe*. Η αυξανόμενη ενεργότητα της CDK αναπαρίσταται με αυξανόμενη ένταση του κόκκινου χρώματος. Με την είσοδο ενός κυττάρου στην G1 φάση τα επίπεδα της ενεργότητας είναι πολύ χαμηλά (λευκό), γεγονός που επιτρέπει την αδειοδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής. Η ενεργότητα αυξάνεται ώσπου να φτάσει στο κατώφλι της φάσης S (T_S , S-phase threshold), όπου γίνεται η μετάβαση στη φάση S. Η συνεχής αύξηση της ενεργότητας CDK οδηγεί στη διαδοχή της φάσης G2, ενώ όταν ξεπεραστεί το κατώφλι M φάσης (T_M , M-phase threshold) τα κύτταρα περνάνε σε μίτωση. Η ακριβής κινητική της αύξησης των επιπέδων της Cdk-δραστηριότητας δεν είναι γνωστή (διακεκομμένη γραμμή) [76].

Η καταστολή της αδειοδότησης κατά τις φάσεις S, G2 και M πραγματοποιείται μέσω γεγονότων φωσφορυλίωσης από την CDK [77]. Στον *S.cerevisiae* για παράδειγμα, ο παράγοντας Cdt1 καθώς επίσης και η υπομονάδα Mcm4 αποτελούν υπόστρωμα για την CDK, ενώ η φωσφορυλίωσή τους προκαλεί την έξοδό τους από τον πυρήνα, καθιστώντας αδύνατη τη φόρτωση του συμπλόκου των MCM στο DNA [78, 79]. Ο παράγοντας Cdc6, αλλά και ο ομόλογός του στον *S.pombe* Cdc18, επίσης υπόκεινται σε φωσφορυλίωση από τη CDK. Η φωσφορυλιωμένη μορφή του Cdc6/Cdc18 και στους δύο οργανισμούς οδηγεί στην αναγνώριση του παράγοντα από τη λιγάση της ουβικουιτίνης SCF οδηγώντας στην αποικοδόμησή του [80-83]. Η υπομονάδα Orc6 του συμπλόκου αναγνώρισης αποτελεί ένα ακόμα υπόστρωμα της CDK. Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωσή της φαίνεται να εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ Orc6 και Cdt1, καταστέλλοντας τη στρατολόγηση του συμπλόκου Cdt1-Mcm2-7 στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής [84].

Στα μετάζωα, η καταστολή της λειτουργίας του Cdt1 αποτελεί τον κύριο μηχανισμό μέσω του οποίου παρεμποδίζεται η αδειοδότηση. Στη φάση G1, κατά την οποία λαμβάνει χώρα η αδειοδότηση της αντιγραφής, τα επίπεδα του Cdt1 είναι υψηλά. Η μετάβαση του κυττάρου στη φάση S συνοδεύεται από ταχεία αποικοδόμηση του Cdt1 από δύο διαφορετικές E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης, την SCF-Skp2 και την DDB1-Cul4 [85]. Εκτός από την πρωτεόλυση κατά την είσοδο στη φάση S, τα κύτταρα διαθέτουν έναν επιπλέον μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης του Cdt1. Η πρωτεΐνη Geminin καταστέλλει τη λειτουργία του Cdt1 προσδένοντας ισχυρά σε αυτόν και παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με το σύμπλοκο των MCM ελικάσων [86]. Η έκφρασή της περιορίζεται στις φάσεις S και G2 ενώ η αποικοδόμηση της ρυθμίζεται από το σύμπλοκο APC [86]. Κατά το τέλος της μίτωσης καθώς και στη φάση G1 που το σύμπλοκο APC είναι ενεργό, η αποικοδόμηση της Geminin οδηγεί σε απελευθέρωση του παράγοντα Cdt1 ο οποίος αλληλεπιδρά με το εξαμερές Mcm2-7 ώστε να ακολουθήσει η φόρτωση των MCM δακτυλίων στο δίκλωνο DNA. Εκτός από το Cdt1, ο παράγοντας Cdc6 επίσης υπόκειται σε ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης από την CDK. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο του Cdc6 από τον πυρήνα [87]. Τέλος και το σύμπλοκο αναγνώρισης ORC υπόκειται σε ρύθμιση της ενεργότητάς του μέσω φωσφορυλίωσης από τη CDK.



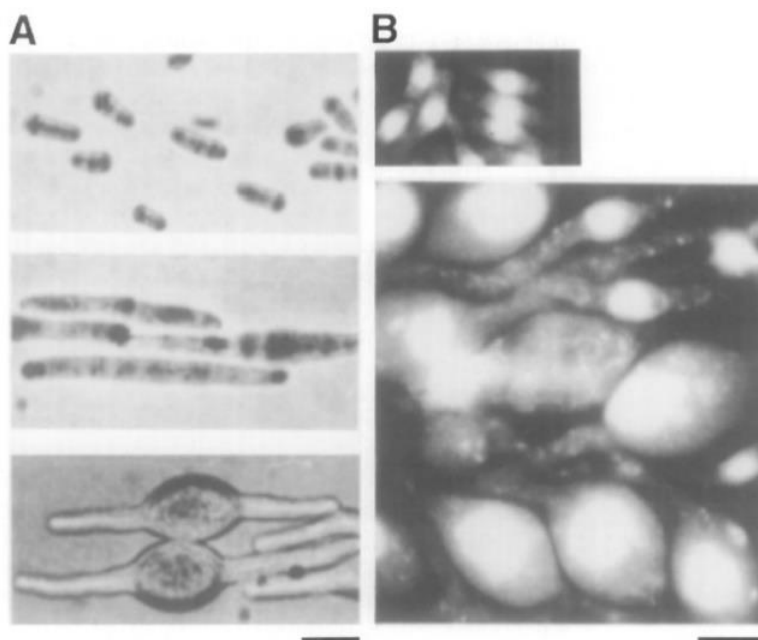
Εικόνα 1.6 5 Μοντέλο δράσης της ενεργότητας CDK για την καταστολή της επαναντιγραφής. Το σύμπλοκο Cdt1-Mcm2-7 και ο παράγοντας Cdc6 προσδένονται στο σύμπλοκο αναγνώρισης ORC στην περιοχή των θέσεων έναρξης και σχηματίζουν το προ-αντιγραφικό σύμπλοκο στη φάση G1, όπου υπάρχει χαμηλή ενεργότητα της CDK. Κατά τη μετάβαση στην S φάση η ενεργότητα της CDK αυξάνεται προκαλώντας έναρξη της αντιγραφής, συναρμολόγηση της αντιγραφικής μηχανής και αποσύνδεση των προ-αντιγραφικών συμπλόκων. Η παρεμπόδιση της επαναντιγραφής επιτυγχάνεται με πολλούς μηχανισμούς: (1) φωσφορυλίωση του παράγοντα Cdc6 οδηγεί στην αποικοδόμησή του, (2) φωσφορυλίωση του συμπλόκου ORC καταστέλλει τη λειτουργία του, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με το Cdc6, (3) φωσφορυλίωση του παράγοντα Cdt1 και των MCM υπομονάδων προκαλεί την έξοδό τους στο κυτταρόπλασμα. Η ρύθμιση των επιπέδων του Cdt1 στα μετάζωα επιτελείται και μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον παράγοντα Geminin (Τροποποιημένη από [88]).

1.3.1 Υπερέκφραση των παραγόντων Cdc6/Cdc18 και Cdt1 προκαλούν επαναντιγραφή στον *S.pombe*

Η ρύθμιση των επιπέδων των αδειοδοτικών παραγόντων Cdc6/Cdc18 και Cdt1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη σωστή χρονική ρύθμιση της πυροδότησης των θέσεων έναρξης της αντιγραφής, καθώς

αυξημένα επίπεδα αυτών έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση επαναντιγραφής τόσο σε μύκητες όσο και σε μετάζωα.

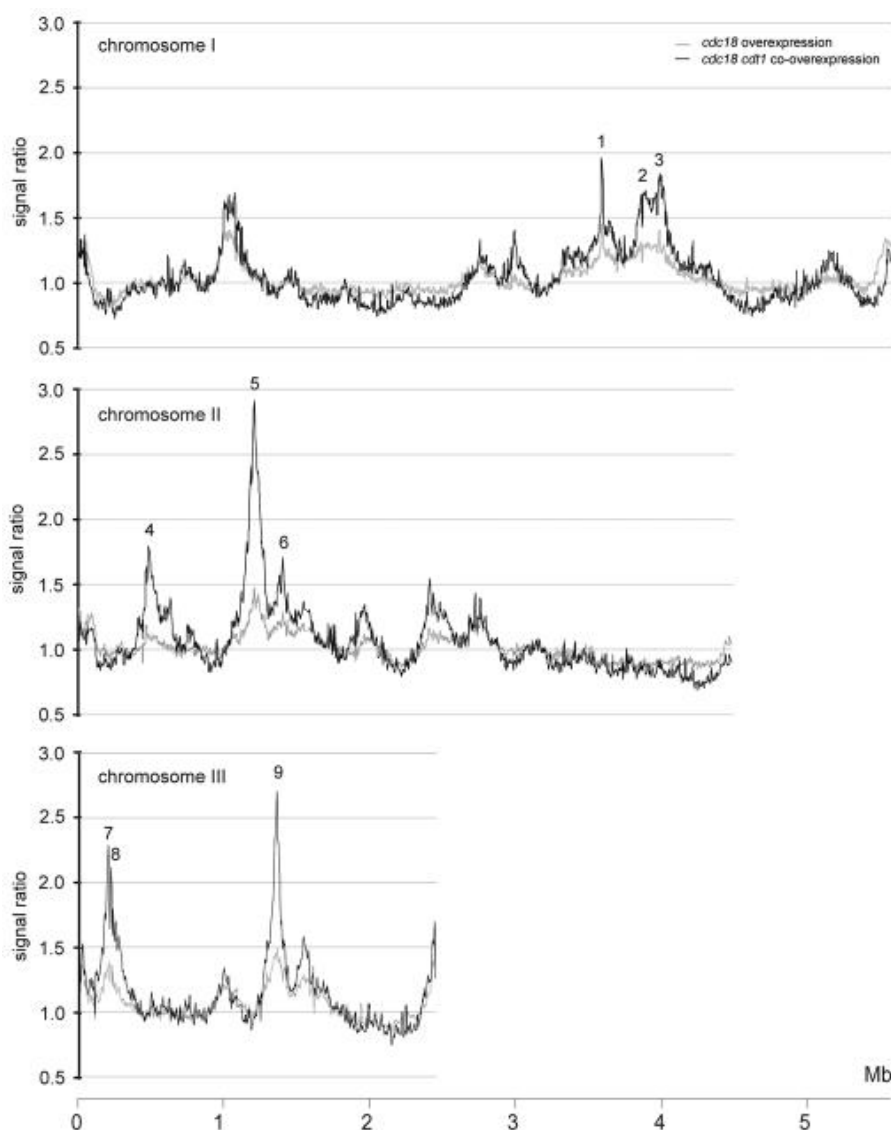
Στον *S.pombe* η υπερέκφραση του Cdc18 (ομόλογο του Cdc6) επιτρέπει στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής να αδειοδοτηθούν ξανά και να πυροδοτήσουν πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής κατά τη διάρκεια της ίδιας φάσης S. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επαναντιγραφή του DNA (DNA re-replication) και οδηγεί και στην αύξηση του συνολικού DNA των κυττάρων έως 8C-16C [89]. Ταυτόχρονη υπερέκφραση του παράγοντα Cdt1 οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση του DNA (έως ~32C) [90-92]. Τα κύτταρα που υπόκεινται σε επαναντιγραφή, δε μπορούν να προχωρήσουν σε μίτωση και αποκτούν χαρακτηριστικό επιμηκυμένο φαινότυπο με διογκωμένους πυρήνες, υποδηλώνοντας ότι η σύνθεση του DNA προχωρά παρά την αναστολή του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 1.7 Υπερέκφραση του παράγοντα Cdc18 στον *S.pombe*. Α) κύτταρα αγρίου (πάνω), κύτταρα που καλλιεργούνται σε τρυβλίο με στερεό ελάχιστο θρεπτικό, μία μέρα (μέση) και 1,5 μέρα (κάτω) μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης του Cdc18. **Β)** Πυρηνική χρώση με DAPI κυττάρων αγρίου τύπου (πάνω) και κυττάρων που μονιμοποιήθηκαν 24 ώρες μετά την υπερέκφραση του Cdc18. Η ράβδος της κλίμακας αντιπροσωπεύει μήκος 10 μ m [89].

Η επαναντιγραφή του γονιδιώματος του *S.pombe* κατά την υπερέκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdc18 και Cdt1 είναι ανομοιόμορφη με εννέα σημεία κατά μήκος του γονιδιώματος να εμφανίζουν υψηλά επίπεδα επαναντιγραφής που

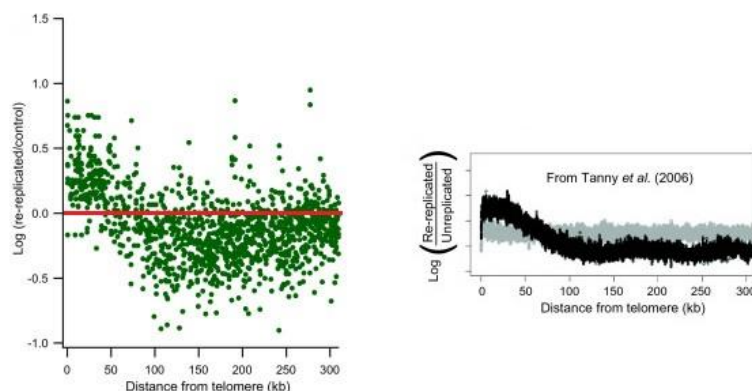
κυμαίνονται μεταξύ 1,5-4 φορές πάνω από το μέσο όρο του γονιδιώματος [93]. Καθώς οι υπόλοιπες περιοχές των χρωμοσμάτων δεν εμφανίζουν σημαντική επαναντιγραφή, φαίνεται πως κατά την παρατεταμένη φάση σύνθεσης του DNA που προκαλείται από την υπερέκφραση των Cdc18 και Cdt1 η πλειοψηφία των θέσεων έναρξης δεν επανενεργοποιείται. Αντίθετα, οι εννέα ενισχυμένες περιοχές πιθανά περιλαμβάνουν αφετηρίες που ξεφεύγουν της ρύθμισης. Επιπλέον, σημαντική ενίσχυση παρατηρείται και στις περιοχές των τελομερών [94].



Εικόνα 1.8 Μη ομοιόμορφη αντιγραφή του γονιδιώματος μετά από υπερέκφραση του παράγοντα Cdc18 μόνο ή σε συνδυασμό με το Cdt1. Τα επίπεδα ενίσχυσης του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος κυττάρων *S.pombe* που υπερέκφραζαν είτε μόνο το Cdc18 είτε σε συνδυασμό με το Cdt1 προσδιορίστηκαν με μικροσυστοιχίες. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μετρήσεις κανονικοποιημένες ως προς το γονιδίωμα φυσιολογικών κυττάρων. 9 περιοχές που κατανέμονται και στα τρία χρωμοσώματα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ενίσχυσης [93].

1.3.2 Επαναντιγραφή των τελομερικών περιοχών στον *S.pombe*

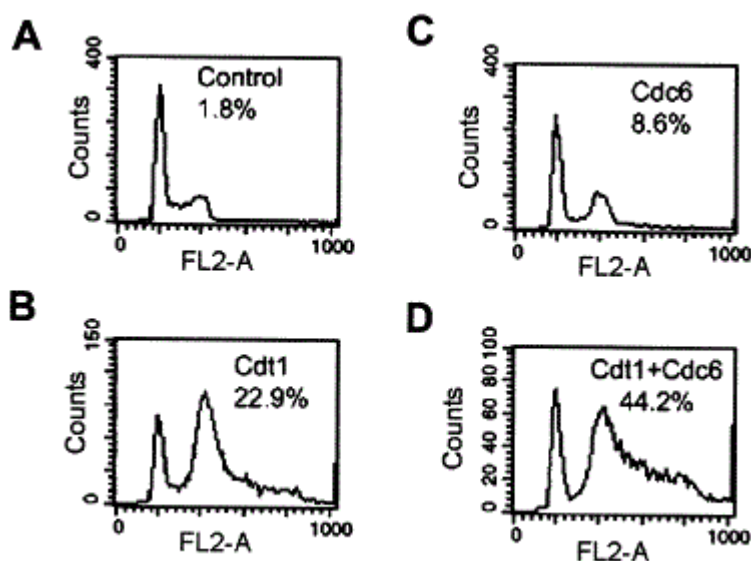
Μελέτη της επαναντιγραφής του γονιδιώματος κυττάρων που πραγματοποιούν υπερέκφραση του παράγοντα Cdc18, έδειξε ότι οι περιοχές των τελομερών εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ενίσχυσης. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι θέσεις έναρξης της αντιγραφής που βρίσκονται είτε στην περιοχή των τελομερών είτε στη γειτονική υποτελομερική περιοχή, ενεργοποιούνται πολλαπλά κατά την επαναντιγραφή του DNA. Στην εικόνα 1.9 παρουσιάζεται τα σχετικά επίπεδα επαναντιγραφής σε σχέση με την απόσταση των περιοχών από τα τελομερή, όπου είναι σαφές ότι υπάρχουν αυξημένα επίπεδα επαναντιγραφής που εκτείνονται σε μία περιοχή 50-75 kb από το τέλος των χρωμοσωμάτων, ενώ ακολουθεί μια περιοχή μεγέθους ~300kb που χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα επαναντιγραφής [94]. Παρόμοιο πρότυπο ενίσχυσης στην περιοχή των τελομερών παρουσιάζει και ο *S.cerevisiae* κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής, όπου αντίστοιχα ένα τμήμα ~50kb από τα άκρα των χρωμοσωμάτων παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ενίσχυσης ακολουθούμενα από μία περιοχή μεγαλύτερη από 300kb που αντιγράφεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το μέσο όρο του γονιδιώματος [95]. Η συντήρηση του μοτίβου επαναντιγραφής στα δύο είδη μυκήτων ίσως να υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιου βασικού χαρακτηριστικού της επαναντιγραφής των τελομερών και δεν αποκλείεται να υφίσταται και σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.



Εικόνα 1.9 Επαναντιγραφή των περιοχών που βρίσκονται κοντά στα τελομερή. Στα διαγράμματα αναπαρίστανται τα σχετικά επίπεδα επαναντιγραφής των περιοχών σε σχέση με την απόστασή τους από το κοντινότερο τελομερές σε κύτταρα *S.pombe* (αριστερά) [94] και τον *S.cerevisiae* (δεξιά) που υπερεκφράζουν τον παράγοντα Cdc18. Στο διάγραμμα δεξιά με μαύρο απεικονίζονται τα κύτταρα *S.cerevisiae* που υπερεκφράζουν Cdc18 (μαύρο) και κύτταρα αγρίου τύπου (γκρι) [95].

1.3.3 Επαναντιγραφή του DNA σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα

Στα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτών έχουν μελετηθεί επίσης αρκετοί μηχανισμοί μέσω των οποίων προκαλείται επαναντιγραφή του DNA. Για παράδειγμα η απαλοιφή του γονιδίου *geminin* [96, 97], η υπερέκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα *Cdt1* [98, 99] αλλά και η απορρύθμιση των επιπέδων της CDK [100]. Η ρύθμιση στην οποία υπόκειται το *Cdt1* μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον παράγοντα *Geminin* είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως η απαλοιφή της *Geminin* επαρκεί για την πρόκληση επαναντιγραφής [96, 97]. Έχει προταθεί ότι η *Geminin* αναστέλλει την επανααδειοδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής λόγω της ισχυρής πρόσδεσής της στον παράγοντα *Cdt1*. Η αλληλεπίδραση μεταξύ *Cdt1* και *Geminin* καθιστά μη ικανή την πρόσδεση του *Cdt1* στο εξαμερές των MCM ελικάσων και κατ' επέκταση αναστέλλεται ο σχηματισμός του προ-αντιγραφικού συμπλόκου. Η επαναντιγραφή λόγω της απαλοιφής του γονιδίου της *Geminin* ωστόσο συμβαίνει μόνο σε καρκινικά κύτταρα. Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν επιπλέον μηχανισμούς για τη ρύθμιση και απενεργοποίηση παραγόντων όπως το *Cdt1* και *Cdc6*, με αποτέλεσμα η απουσία της *Geminin* να μην επαρκεί για την εμφάνιση επαναντιγραφής [101, 102]. Η υπερέκφραση του παράγοντα *Cdt1* είναι ικανή να προκαλέσει επαναντιγραφή σε κύτταρα ανώτερων ευκαρυωτών, όπως προκύπτει μέσα από μελέτες τόσο σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου [99] όσο και σε εκχυλίσματα ωαρίων *X. Laevis* [103]. Αντιθέτως τα υψηλά επίπεδα του αδειοδοτικού παράγοντα *Cdc6* δεν είναι ικανά να οδηγήσουν σε σημαντική επαναντιγραφή, ωστόσο όμως συμβάλλουν στην ενίσχυση της επαναντιγραφής που συμβαίνει κατά την υπερέκφραση του *Cdt1* [99].



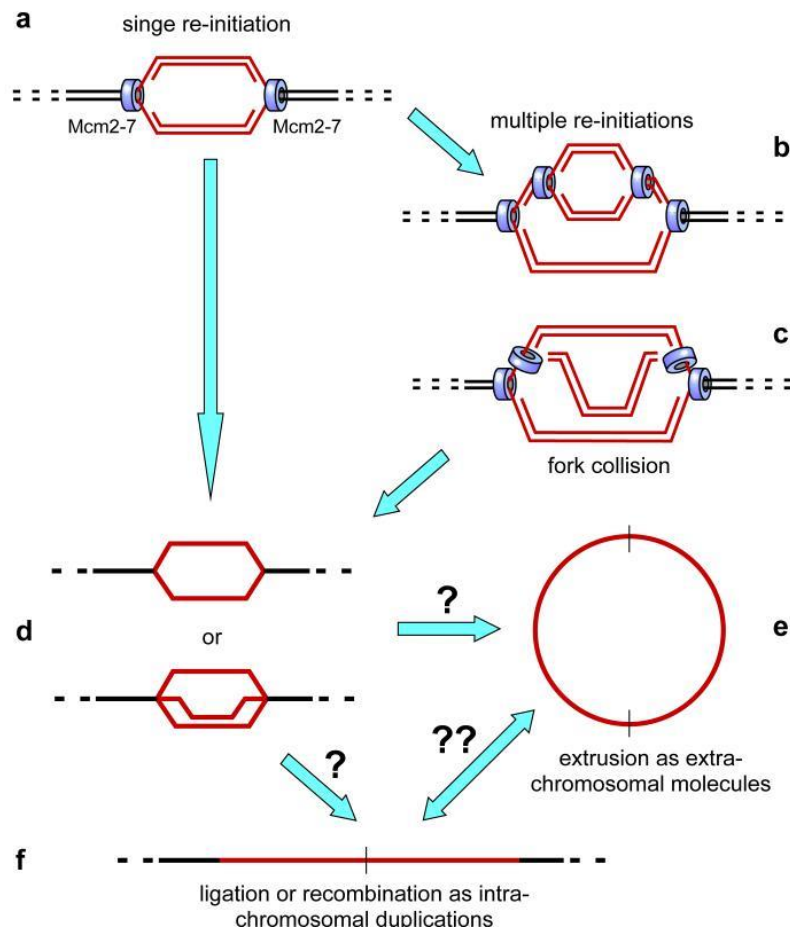
Εικόνα 1.10 Υπερέκφραση των παραγόντων Cdt1 ή/και Cdc6 σε καρκινικά κύτταρα H1299. **Ανάλυση** με κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό περιεχόμενου DNA σε κύτταρα αγρίου τύπου (A), κύτταρα που υπερεκφράζουν είτε τον παράγοντα Cdt1 (B) είτε το Cdc6 (C) είτε τον συνδυασμό τους (D). Τα αναγραφόμενα ποσοστά αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των κυττάρων που έχουν περιεχόμενο DNA περισσότερο σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται στη φάση $>G2/M$ DNA[99].

Στην καρκινική σειρά του πνεύμονα H1299, η υπερέκφραση του Cdt1 οδηγεί σε επαναपुरοδότηση της αντιγραφής μέσα σε 4 ώρες από την είσοδο των κυττάρων στη φάση S. Η αύξηση του συνολικού περιεχομένου DNA στα κύτταρα αυτά δεν προκαλείται από προβλήματα κατά τη μίτωση, καθώς όπως διαπιστώθηκε τα κύτταρα δεν προχωρούν σε μίτωση. Επιπλέον φαίνεται ότι η υπερέκφραση του Cdt1 επηρεάζει κατά κύριο λόγο τις αφετηρίες που υπό φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποιούνται στα πρώτα στάδια της S φάσης [99]. Η επαναντιγραφή του γονιδιώματος που επάγεται από τα υψηλά επίπεδα του Cdt1, πιστεύεται ότι προκαλείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους αδειοδότησης των θέσεων έναρξης της αντιγραφής. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι εξωγενής υπερέκφραση μεταλλαγμάτων του Cdt1 που δε διαθέτουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το εξαμερές των MCM επάγουν την επαναντιγραφή υποδεικνύοντας ότι το Cdt1 μπορεί να επηρεάζει τη διαδικασία και με έμμεσο τρόπο. Έχει προταθεί ότι η εξωγενής μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Cdt1 αλληλεπιδρά και δεσμεύει τον παράγοντα PCNA και τις CDKs με αποτέλεσμα η ενδογενής φυσιολογική μορφή του Cdt1 να παραμένει ικανή να προκαλέσει επαναδειοδότηση των αφετηριών [104].

1.4 Η επαναντιγραφή του DNA οδηγεί σε αντιγραφικό στρες και γονιδιωματική αστάθεια

Η αντιγραφή του DNA είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία πραγματοποιείται με τη συνεργασία πολλών παραγόντων και ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα. Αποκλίσεις από τη φυσιολογική ρύθμιση της διαδικασίας προκαλούν αντιγραφικό στρες στα κύτταρα. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που γνωρίζουμε ότι προκαλούν αντιγραφικό στρες. Για παράδειγμα η διαδικασία της επαναντιγραφής συχνά οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων των dNTPs στα κύτταρα με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της διαδικασίας. Επίσης κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος λόγω επαναπυροδότησης των αφετηριών, η αντιγραφή καθυστερεί λόγω δευτεροταγών δομών που δημιουργούνται στο DNA. Εκτός από την επαναντιγραφή, και η περιορισμένη ή μη καλά συγχρονισμένη πυροδότηση των αφετηριών μπορεί να οδηγήσει σε αντιγραφικό στρες, καθώς τα κύτταρα δε μπορούν να ολοκληρώσουν το διπλασιασμό του DNA τους μέσα στα χρονικά περιθώρια της S φάσης και οδηγούνται στη μίτωση ενώ διαθέτουν περιοχές που δεν έχουν διπλασιαστεί. Τέλος, εξωγενείς παράγοντες μπορούν επίσης να προκαλέσουν αντιγραφικό στρες, όπως για παράδειγμα η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Μια από τις σημαντικότερες αιτίες αντιγραφικού στρες, αποτελεί η επαναντιγραφή. Κατά την επαναντιγραφή του DNA, η επαναπυροδότηση των θέσεων έναρξης δημιουργεί ιδιαίτερες δομές με αντιγραφικές διχάλες να αναδύονται μέσα από ήδη υπάρχουσες διχάλες. Οι νέες αντιγραφικές διχάλες που δημιουργούνται, σύντομα σταματούν να κινούνται λόγω της σύγκρουσής τους με τις προπορευόμενες, με αποτέλεσμα το σταμάτημα της αντιγραφής [105]. Η σύγκρουση των διχαλών κατά την επαναντιγραφή τελικά οδηγεί σε διπλές θραύσεις στο DNA και σε δημιουργία μονόκλωνων δομών. Οι περιοχές που επαναντιγράφονται αναγνωρίζονται από μηχανισμούς απόκρισης σε βλάβη του DNA και πιθανά γίνονται υποστρώματα για ομόλογο ανασυνδυασμό. Τα ενισχυμένα τμήματα μπορούν στη συνέχεια είτε να αποκοπούν και να δημιουργήσουν εξωχρωμοσωμικά κυκλικά μόρια DNA είτε να ανασυνδυαστούν και να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα δημιουργώντας ενδοχρωμοσωμικό διπλασιασμό [106].



Εικόνα 1.11 Επιπτώσεις επαναντιγραφής. Στην εικόνα παρουσιάζεται τμήμα του γονιδιώματος που περιλαμβάνει θέση έναρξης της αντιγραφής. Η πυροδότηση της αφετηρίας οδηγεί στη δημιουργία της αντιγραφικής διχάλας (a). Επαναλαμβανόμενη πυροδότηση της ίδιας θέσης έναρξης οδηγεί σε σύγκρουση των αντιγραφικών διχαλών (b-c). Οι δομές του DNA που παραμένουν είτε αποκόπτονται από το χρωμόσωμα και δημιουργούν εξωχρωμοσωμικά κυκλικά μόρια (e), είτε ανασυνδυάζονται και ενσωματώνονται στο γονιδίωμα δημιουργώντας ενδοχρωμοσωμικό διπλασιασμό της περιοχής [106].

1.5 Ενεργοποίηση μηχανισμών απόκρισης στη βλάβη κατά την επαναντιγραφή γονιδιώματος

Έχει παρατηρηθεί ότι η απορρύθμιση του συστήματος αδειοδότησης μπορεί να προκαλέσει επαναντιγραφή σε συγκεκριμένες καρκινικές σειρές, ενώ σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές και ορισμένες καρκινικές δε φαίνεται να επάγεται επαναντιγραφή του DNA, αλλά ενεργοποιούνται σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου [99, 107, 108].

Οι κινάσες ATM και ATR αποτελούν βασικά μόρια που εμπλέκονται στην ανίχνευση μη φυσιολογικών δομών και βλαβών στο DNA και οδηγούν στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και στις επακόλουθες αποκρίσεις του κυττάρου. Οι διπλές θραύσεις στο γενετικό υλικό επάγουν την ενεργοποίηση της ATM κινάσης (Ataxia-telangiectasia mutated). Αρχικά οι διπλές θραύσεις αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο MRN (Mre11–Rad50–Nbs1) το οποίο με τη σειρά του στρατολογεί την ATM στο σημείο της βλάβης. Στη συνέχεια η ATM φωσφορυλιώνει την καρβοξυτελική ουρά της ιστόνης H2AX. Η γ-H2AX αναγνωρίζεται από τον παράγοντα Mdc1 [109] ο οποίος προσδένεται άμεσα στην ιστόνη, ενώ επίσης αλληλεπιδρά και με την υπομονάδα Nbs1 του MRN συμπλόκου οδηγώντας στην εξάπλωση της γH2AX που αποτελεί τη βάση για τη συναρμολόγηση των παραγόντων επιδιόρθωσης [110, 111]. Η αύξηση της ATM τοπικά στο σημείο της βλάβης έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της κινάσης Chk2. Αντίθετα καθυστέρηση της αντιγραφικής μηχανής καθώς και μονές θραύσεις του DNA οδηγούν στην ενεργοποίηση της κινάσης ATR. Η αναστολή της αντιγραφής αφήνει εκτεθειμένα μονόκλωνα τμήματα DNA τα οποία προσδένονται από την πρωτεΐνη RPA, η οποία με τη σειρά της προσελκύει την ATR και οδηγεί σε φωσφορυλίωση της Chk1 [112].

Κατά την υπερέκφραση του Cdt1 σε πρωτογενείς αλλά και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές που δεν επηρεάζονται από την υπερέκφραση του Cdt1, η απενεργοποίηση της ATR αλλά και της Chk1 που βρίσκεται καθοδικά προκαλεί εκτενή επαναντιγραφή του γονιδιώματος. Αντίθετα δεν ανιχνεύεται επαναντιγραφή κατά την απενεργοποίηση της ATM και της Chk2 [108]. Έτσι λοιπόν φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου στην φάση S του κυτταρικού κύκλου που διαμεσολαβείται από την ATR, παίζει κεντρικό ρόλο στην αποφυγή της επαναντιγραφής κάτω από συνθήκες επαναδεδιοδότησης και επαναντιγραφής. Η ενεργοποίηση λοιπόν της ATR αποτελεί έναν ακόμα μηχανισμό των κυττάρων ώστε να εξασφαλίσουν τον σωστό διπλασιασμό του γονιδιώματός τους. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι κατά την επαναδεδιοδότηση ενεργοποιείται και το μονοπάτι της ATM, ωστόσο η ενεργοποίηση αυτή συμβαίνει μετά από αυτή της ATR [108]. Η υπερέκφραση του Cdt1 συνοδεύεται από πρόσδεση της RPA στα μονόκλωνα τμήματα του DNA που δημιουργούνται και ενεργοποίηση της ATR πριν προλάβει να συμβεί εκτεταμένη επαναντιγραφή. Η ενεργοποίηση της ATM συμβαίνει αρκετά αργότερα όταν δημιουργούνται και ανιχνεύονται διπλές θραύσεις στο DNA. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της ATR συμβαίνει στα πρώιμα στάδια της επαναντιγραφής και συμβάλλει στην καταστολή του φαινομένου.

Κατά την υπερέκφραση του Cdt1 ή απουσία της Geminin, το Cdt1 οδηγεί σε επαναφόρτωση των MCM ελικάσων στο DNA και την επαναδημιουργία των προ-αντιγραφικών συμπλόκων κατά τη φάση S. Σε περίπτωση καταστολής της έναρξης της επαναντιγραφής, για παράδειγμα μέσω αναστολής της ενεργότητας της CDK, δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου της φάσης S, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επανασυγκρότηση των προ-αντιγραφικών συμπλόκων λόγω των αυξημένων επιπέδων του Cdt1 δεν επαρκούν για την ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου της φάσης S μέσω της ATR οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλών στόχων καθοδικά που τελικά καταλήγουν στην αναστολή της επαναντιγραφής του DNA. Αρχικά, η ATR έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει άμεσα την ενεργότητα της αντιγραφικής μηχανής, φωσφορυλιώνοντας στόχους όπως η MCM2, είτε να αναστέλλει έμμεσα την αντιγραφή μέσω των παραγόντων Rb και p53 [99, 108, 113]. Η καταστολή της επαναντιγραφής απαιτεί τη σωστή και άμεση δράση όλων των μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της ATR. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί η απορρύθμιση του παράγοντα Cdt1 ή της Geminin μπορεί να επιφέρει εκτεταμένη επαναντιγραφή του γονιδιώματος στην περίπτωση ορισμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών που ενδεχομένως να μη διαθέτουν όλους τους παράγοντες του μονοπατιού της ATR, ενώ αντίθετα δε φαίνεται να έχει επίδραση σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές.

Η καταστολή της επαναντιγραφής του DNA μέσω της ενεργοποίησης του σημείου ελέγχου της φάσης S αποτελεί συντηρημένη λειτουργία πολλών οργανισμών. Στον *S.cerevisiae* η απορρύθμιση του συστήματος αδειοδότησης προκαλεί πολύ πιο εκτεταμένη επαναντιγραφή του γονιδιώματος απουσία του λειτουργικού παράγοντα Mec1 (ομόλογο της ATR) [114].

1.6 Επαναντιγραφή DNA και καρκινογένεση

Πολλοί τύποι καρκίνου παρουσιάζουν αποκλίσεις ως προς την έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα διαπιστώθηκε πως το 43% και το 50% παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης των Cdt1 και Cdc6 αντίστοιχα [115]. Επιπλέον, υπερέκφραση των Cdt1 και Cdc6 έχει παρατηρηθεί και σε άλλους καρκινικούς τύπους όπως το λέμφωμα μανδύα, καρκίνο του παχέος εντέρου και

καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου [115-117]. Συχνά συναντάται η ταυτόχρονη υπερέκφραση των παραγόντων Cdt1, Cdc6 και E2F1. Οι παράγοντες E2F1 και E2F2 αποτελούν βασικούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές των Cdt1 και Cdc6, ενώ έχειδειχθεί σε αρκετές περιπτώσεις πως η υπερέκφραση των E2F συμβάλει στην αύξηση των επιπέδων των Cdt1 και Cdc6 [115, 118]. Εκτός από τη μεταγραφική ρύθμιση, η υπερέκφραση των Cdt1 και Cdc6 μπορεί να οφείλεται και σε γονιδιακή ενίσχυση των αντίστοιχων γενετικών τόπων [116]. Φαίνεται λοιπόν ότι η απορρύθμιση των επιπέδων των Cdt1 και Cdc6 και η επακόλουθη επαναντιγραφή του DNA, σχετίζονται στενά με την καρκινογένεση.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η απορρύθμιση των επιπέδων των Cdt1 και Cdc6 αποτελεί έναυσμα για την καρκινογένεση ή αποτελεί απόρροια του αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, μελετήθηκε η έκφραση των δύο παραγόντων σε διαφορετικά καρκινικά και προ-καρκινικά στάδια καρκίνου του πνεύμονα του παχέος εντέρου και καρκινώματος της κεφαλής και του τραχήλου [116]. Και οι δύο παράγοντες εμφανίζουν υπερέκφραση σε επίπεδο mRNA σε υπερπλασίες σε σχέση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς που μελετήθηκαν, ενώ σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρήθηκαν μέχρι και τέσσερις φορές υψηλότερα επίπεδα σε δυσπλασίες και καρκινώματα. Η αυξημένη έκφρασή τους επίσης δε φαίνεται να σχετίζεται με το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών, καθώς δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων Cdt1/Cdc6 και του δείκτη Ki-67.

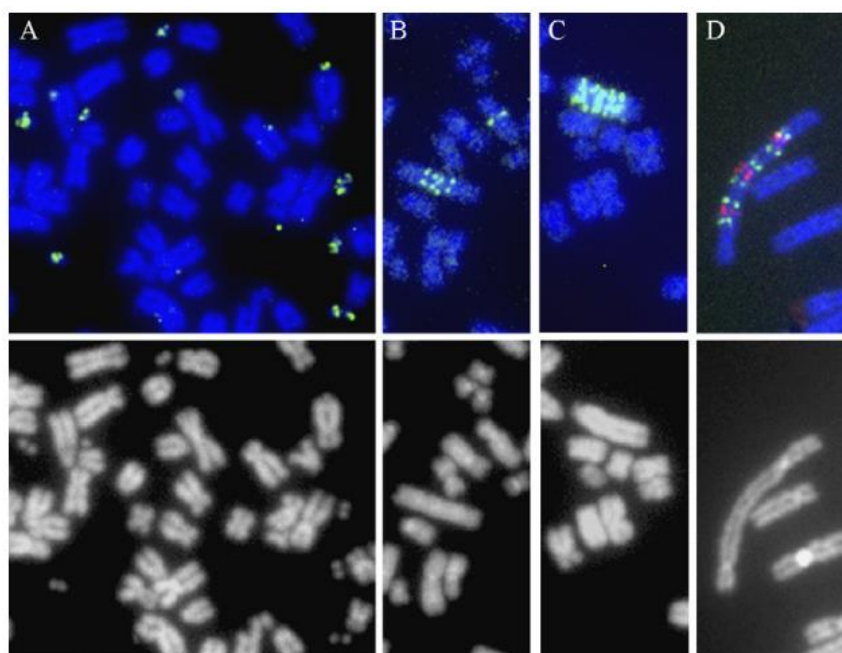
Έχει προταθεί ότι η υπερέκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 οδηγεί σε επαναντιγραφή του DNA η οποία με τη σειρά της προκαλεί γονιδιωματική αστάθεια και πυροδοτεί μηχανισμούς απόκρισης σε βλάβη του DNA. Η ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου λειτουργούν ως φραγμός στην καρκινογένεση οδηγώντας είτε σε γήρανση είτε σε απόπτωση έτσι ώστε να εξαλειφθούν τα κύτταρα που φέρουν τις αλλοιώσεις που προκλήθηκαν κατά την επαναντιγραφή. Η απουσία παραγόντων όπως το p53 αίρει το φραγμό αυτό και τα κύτταρα οδηγούνται στην καρκινογένεση. Συνεπώς παρατηρείται συχνά ότι οι τύποι καρκίνου στους οποίους συμβαίνει υπερέκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 χαρακτηρίζονται από μη λειτουργικό p53 [115, 117].

1.7 Γονιδιακή ενίσχυση

Η καρκινογένεση σα φαινόμενο σχετίζεται πολύ στενά με την απόκτηση αλλοιώσεων τόσο σε γενετικό όσο και σε επιγενετικό επίπεδο και την επακόλουθη αλλαγή στην έκφραση των εμπλεκόμενων γονιδίων. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να είναι σημειακές μεταλλάξεις, αλλαγές που αφορούν σε μεγαλύτερα τμήματα χρωμοσωμάτων όπως διπλασιασμοί και μετατοπίσεις, αλλά και διαφοροποιήσεις στο επιγενετικό τοπίο των κυττάρων. Η γονιδιακή ενίσχυση, η οποία χαρακτηρίζεται ως η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μιας περιοχής του γονιδιώματος, αποτελεί συχνή μεταλλαγή σε πολλά είδη καρκίνων, και πιστεύεται πως επηρεάζει τη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων μέσω της υπερέκφρασης των γονιδίων που περιλαμβάνουν οι περιοχές οι έχουν υποστεί ενίσχυση. Εκτός από την καρκινογένεση, η γονιδιακή ενίσχυση συμμετέχει και σε φυσιολογικές διαδικασίες κατά την ανάπτυξη, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ενίσχυση των γονιδίων του χορίου κατά την ωογένεση στη *Drosophila* [119]. Επιπλέον, αρκετές μελέτες σε βακτήρια, μύκητες, τη *Drosophila* αλλά και αθανατοποιημένα κύτταρα θηλαστικών έδειξαν ότι η γονιδιακή ενίσχυση μπορεί να σχετίζεται με την απόκτηση ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένα φάρμακα. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, η έκθεσή τους σε αντικαρκινικά φάρμακα οδηγεί στη γονιδιακή ενίσχυση των γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση στα φάρμακα αυτά, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να αποκτούν ανθεκτικότητα και ένα ισχυρό πλεονέκτημα για την επιβίωσή τους [120-123]. Η πρώτη μελέτη συσχέτισης της γονιδιακής ενίσχυσης με την εμφάνιση ανθεκτικότητας αφορούσε την ενίσχυση του γονιδίου της διϋδροφολική αναγωγάσης DHFR (Dihydrofolate Reductase) σε κύτταρα σαρκώματος μυών με ανθεκτικότητα στη μεθοτρεξάτη (MTX) [124]. Η πρωτεΐνη DHFR καταλύει την αναγωγή του διϋδροφολικού οξέος (FH_2) σε τετραϋδροφολικό (FH_4) το οποίο εν συνεχεία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πουρινών και γλυκίνης. Η μεθοτρεξάτη αποτελεί αναστολέα της ενεργότητας της DHFR και οδηγεί σε αναστολή της αντιγραφής του DNA και κυτταροτοξικότητα. Έπειτα από παρατεταμένη έκθεση στη μεθοτρεξάτη, τα κύτταρα που επιβίωσαν χαρακτηρίζονταν από αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου DHFR. Ένα ακόμα παράδειγμα συσχέτισης γονιδιακής ενίσχυσης και ανθεκτικότητας αποτελεί το γονίδιο CAD (Carbamoyl-Phosphate Synthetase 2, Aspartate Transcarbamylase, And Dihydroorotase). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα ένζυμο με τριπλή λειτουργία το οποίο εμπλέκεται στα πρώτα στάδια της βιοσύνθεσης των πυριμιδινών. Ενίσχυση του γονιδίου CAD παρατηρήθηκε σε κύτταρα *Mesocricetus auratus* που εμφάνιζαν

ανθεκτικότητα στην ουσία N-φωσφο-ακετυλο-l-ασπαρτικό το οποίο αποτελεί καταστολέα της τρανσκαβαμυλάσης [125].

Ανάλυση των ενισχυμένων περιοχών του γονιδιώματος σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών και καρκινικά δείγματα έδειξε ότι μπορούν να σχηματίζουν εξωχρωμοσωμικές δομές που ονομάζονται Double Minutes (DMs), είτε να ενσωματώνονται ως επαναλήψεις στο ίδιο χρωμόσωμα σχηματίζοντας περιοχές που ονομάζονται homogeneously staining regions (HSRs) [126]. Το μέγεθος των ενισχυμένων περιοχών του γονιδιώματος μπορεί να ποικίλει από μερικά kb σε δεκάδες mb, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις οι περιοχές μπορεί να περιλαμβάνουν τμήματα από διαφορετικά χρωμοσώματα υποδεικνύοντας την ύπαρξη πολύπλοκων διαδικασιών που εμπλέκονται κατά τη γονιδιακή ενίσχυση.



Εικόνα 1.12. Οργάνωση ενισχυμένου γονιδιώματος στον πυρήνα κυττάρων HeLa ανθεκτικά σε μεθοτρεξάτη. Στο πάνω μέρος της εικόνα το πράσινο σήμα αντιστοιχεί σε σήμα υβριδοποίησης για την αλληλουχία του DHFR γονιδίου (5q14.1) και το κόκκινο σε σήμα υβριδοποίησης για μια χρωμοσωμική αλληλουχία στην περιοχή 5q15. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται η χρώση DAPI. A) Παραδείγματα double minutes που περιλαμβάνουν το γονίδιο DHFR. B, C) ενδοχρωμοσωμική ενίσχυση του γονιδίου DHFR. D) Διπλή σήμανση FISH υποδεικνύει την οργάνωση των ενισχυμένων περιοχών σε ανεστραμμένες επαναλήψεις (Inverted repeats) [126].

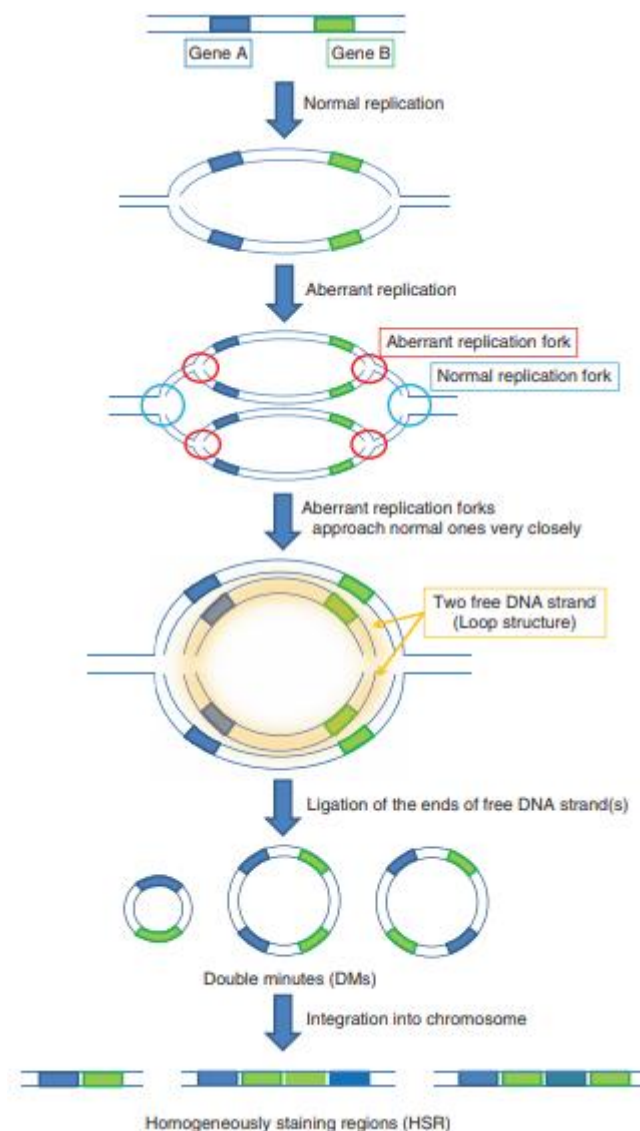
1.8 Μηχανισμοί πρόκλησης γονιδιακής ενίσχυσης

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη γονιδιακή ενίσχυση. Βασικότερες αιτίες πρόκλησης γονιδιακής ενίσχυσης αποτελούν τα σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA, η μη φυσιολογική λειτουργία των τελομερών και η ύπαρξη εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων στο γονιδίωμα [126, 127]. Σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA και συγκεκριμένα επαναντιγραφή του, προκαλεί κατάρρευση των αντιγραφικών θηλιών. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλών θραύσεων στο DNA που πυροδοτούν μονοπάτια επιδιόρθωσης και τελικά οδηγούν σε αύξηση του αριθμού αντιγράφων των συγκεκριμένων περιοχών. Ο μηχανισμός αυτός έχει προταθεί στην περίπτωση της ενίσχυσης των γονιδίων MYCN [128], EGFR [129] και ERBB2 (Her2) [130].

Ο βασικός ρόλος των τελομερών είναι η προστασία από την απώλεια γενετικής πληροφορίας κατά την ατελή αντιγραφή του DNA των άκρων των γραμμικών χρωμοσωμάτων. Η διατήρηση του μήκους των τελομερών πραγματοποιείται από το ειδικό ένζυμο τελομεράση το οποίο παραμένει ανενεργό στα περισσότερα σωματικά κύτταρα, οδηγώντας σταδιακά σε μείωση των τελομερών από γενιά σε γενιά. Αντιθέτως, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να επανενεργοποιούν την τελομεράση έτσι ώστε να επαναφέρουν το μήκος των τελομερών του. Ωστόσο, στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης που τα κύτταρα δεν έχουν ακόμα αυτή την ικανότητα, τα τελομερή υπόκεινται σε φθορά γεγονός που τα καθιστά ευαίσθητα σε γεγονότα σύντηξης και χρωμοσωμικών ανακατατάξεων [131-134].

1.8.1 Γονιδιακή ενίσχυση έπειτα από επαναντιγραφή γονιδιώματος

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί που έχει προταθεί ότι προκαλούν γονιδιακή ενίσχυση. Ήδη από τη δεκαετία του 80 είχε προταθεί ότι η επαναντιγραφή τμημάτων του γονιδιώματος μπορεί να οδηγήσει στη γονιδιακή ενίσχυση. Η παρατήρηση ότι σε πρωτόγονα κύτταρα νευροβλαστώματος παρατηρούνται μόνο double minutes ενώ μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια εμφανίζονται και HSR ενισχύει την υπόθεση ότι αρχικά οι ενισχυμένες περιοχές σχηματίζουν εξωχρωμοσωμικές δομές οι οποίες στη συνέχεια ενσωματώνονται στο γονιδίωμα [135].

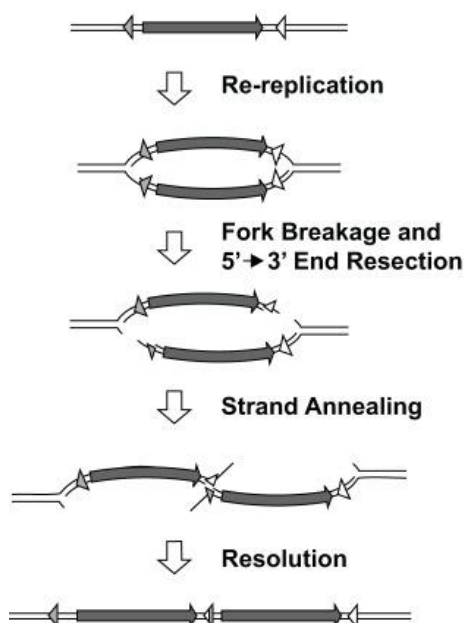


Εικόνα 1.13 Γονιδιακή ενίσχυση έπειτα από επαναντιγραφή. Η επαναπυροδότηση μιας θέσης έναρξης της αντιγραφής δημιουργεί επιπλέον ένθετες διχάλες αντιγραφής προκαλώντας τη σύγκρουσή τους και τη δημιουργία διπλών θραύσεων. Τα άκρα των τμημάτων που σχηματίζονται έχουν τη δυνατότητα να ενωθούν με τη βοήθεια κάποιας λιγάσης δημιουργώντας *double minutes*. Η ενσωμάτωση των *double minutes* στο γονιδίωμα οδηγεί στη δημιουργία των HSRs [136].

Στην εικόνα 1.13 παρουσιάζεται το μοντέλο γονιδιακής ενίσχυσης μέσω επαναντιγραφής και ανασυνδυασμού. Σύμφωνα με αυτό, η επανέναρξη της αντιγραφής από μια αφετηρία οδηγεί σε σύγκρουση των αντιγραφικών θηλιών που σχηματίζονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλών θραύσεων στο DNA. Η ένωση των ελεύθερων άκρων των τμημάτων DNA που επαναντιγράφονται οδηγούν στο σχηματισμό *double minutes*, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ανασυνδυαστούν και να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα.

Μελέτες στον *Saccharomyces cerevisiae* έδειξαν ότι η επαναντιγραφή του γονιδιώματος μπορεί να προκαλέσει γονιδιακή ενίσχυση. Οι περιοχές που ενισχύονται

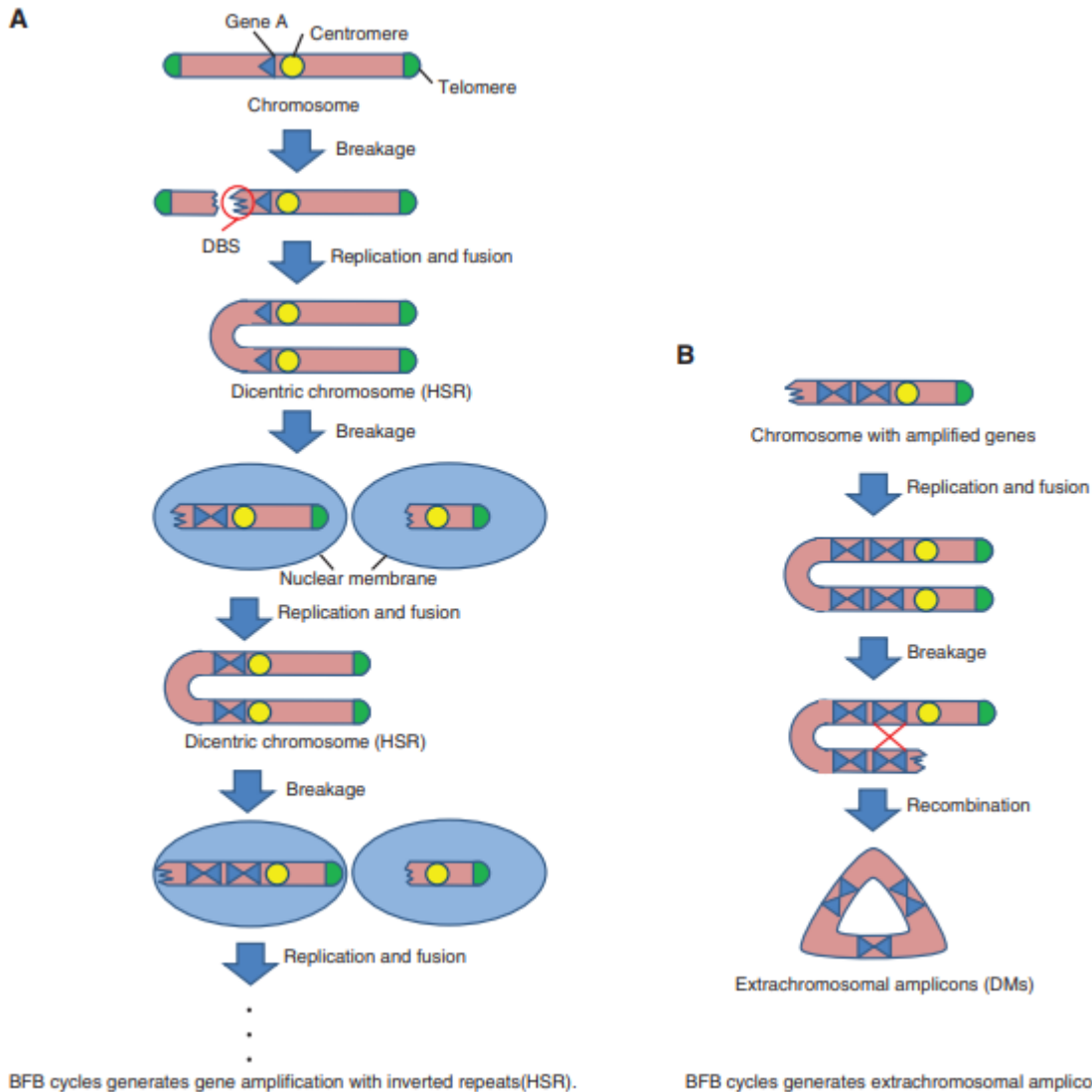
αποτελούν μεγάλα χρωσωμικά τμήματα που πλαισιώνονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ ενσωματώνονται με κατεύθυνση head-to-tail. Η διαδικασία της ενίσχυσης έπειτα από επαναντιγραφή επιτελείται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μη αλληλόμορφων αλληλουχιών (Non-Allelic Homologous Recombination, NAHR) μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που βρίσκονται εκατέρωθεν των ενισχυμένων περιοχών [137]. Οι θηλιές που δημιουργούνται κατά την επαναντιγραφή του γονιδιώματος είναι εξαιρετικά εύθραυστές με αποτέλεσμα τη συχνή δημιουργία διπλών θραύσεων στο DNA. Θραύση των αντιγραφικών θηλιών σε σημεία που περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για επιδιορθωτικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως τα άκρα των τμημάτων που σπάνε υπόκεινται σε εκτομή αφήνοντας εκτεθειμένα τμήματα DNA που περιλαμβάνουν τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και αποτελούν υπόστρωμα για ανασυνδυασμό μέσω του μονοπατιού ανασύνδεσης μονού κλώνου (Single Strand Annealing, SSA). Η επιδιόρθωση μέσω του SSA των αντιγραφικών θηλιών οδηγεί σε διπλασιασμό της περιοχής και ενσωμάτωση στο γονιδίωμα με διαδοχική διάταξη (tandem duplication) [138].



Εικόνα 1.14 Γονιδιακή ενίσχυση στον *S.cerevisiae* έπειτα από επαναντιγραφή και επιδιόρθωση μέσω SSA. Κατά την επαναντιγραφή του γονιδιώματος, η θραύση των αντιγραφικών θηλιών σε σημεία που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οδηγεί σε επιδιόρθωση της βλάβης μέσω ανασύνδεσης μονού κλώνου (SSA). Η διαδικασία αυτή δημιουργεί διπλασιασμό της περιοχής με κατεύθυνση head-to-tail [138].

1.8.2 Γονιδιακή ενίσχυση μέσω του μηχανισμού BFB

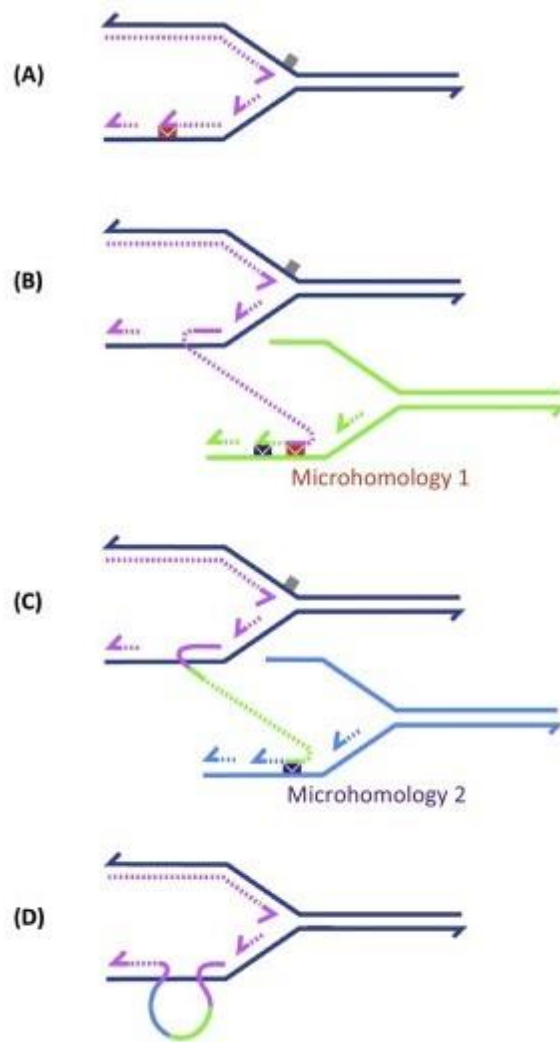
Ένας ακόμα βασικός μηχανισμός γονιδιακής ενίσχυσης βασίζεται στην επανάληψη των κύκλων θραύσης-ένωσης-γεφυρώματος (BFB, Breakage-Fusion-Bridge). Το μοντέλο αυτό προτάθηκε από την McClintock το 1941, η οποία χρησιμοποιώντας τον οργανισμό *Zea mays* επιβεβαίωσε ότι η πρόκληση διπλών θραύσεων με ακτινοβολία Χ προκαλούσε κύκλους BFB [139, 140]. Σύμφωνα με το μοντέλο, η διαδικασία ξεκινά με τη δημιουργία μίας διπλής θραύσης που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των τελομερικών αλληλουχιών. Καθώς πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA, παράγονται δυο αδελφές χρωματίδες στις οποίες απουσιάζουν τα τελομερή. Στη συνέχεια τα άκρα των αδελφών χρωματίδων υπόκεινται σε σύντηξη με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δικεντρικού χρωμοσώματος. Καθώς προχωράει ο κυτταρικός κύκλος και τα κύτταρα εισέρχονται στην ανάφαση, τα δύο κεντρομερή του δικεντρικού χρωμοσώματος απομακρύνονται από τους μικροσωληνίσκους του κινητοχώρου δημιουργώντας δομές που μοιάζουν με γέφυρες χρωματίνης. Η μηχανική τάση που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων προκαλεί τη θραύση του δικεντρικού χρωμοσώματος σε τυχαία θέση με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός άκρου χωρίς τελομερές. Με την αντιγραφή του DNA κατά τη φάση S το άκρο αυτό μπορεί και πάλι να συντηχθεί και έτσι να επαναληφθεί ο κύκλος BFB. Κατά τη διαδικασία αυτή δημιουργούνται HSR όπου οι ενισχυμένες περιοχές εμφανίζουν ανεστραμμένη κατεύθυνση (inverted repeats) είτε double minutes. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι BFB έχουν παρατηρηθεί και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Αποτελούν τον κύριο μηχανισμό γονιδιακής ενίσχυσης του ογκογονιδίου ERBB2 και μπορεί να οδηγήσει σε δεκάδες αντίγραφα [141]. Ο ίδιος μηχανισμός φαίνεται ότι εμπλέκεται στη γονιδιακή ενίσχυση σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος, όπου τα κύτταρα εμφάνιζαν εξαιρετικά υψηλή συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών γεφυρών κατά την ανάφαση και δικεντρικών χρωμοσωμάτων [142].



Εικόνα 1.15 Γονιδιακή ενίσχυση μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων θραύσης-ένωσης-γεφυρώματος (BFB). Αρχικά, η πρόκληση διπλής θραύσης οδηγεί στην απώλεια του τελομερούς. Κατά την αντιγραφή του συγκεκριμένου χρωμοσώματος οι αδελφές χρωματίδες που παράγονται δεν έχουν τελομερές και μπορούν να συντηχθούν σχηματίζοντας ένα δικεντρικό χρωμόσωμα. Το χρωμόσωμα αυτό δημιουργεί χρωματινική γέφυρα κατά την ανάφαση, η οποία σπάει και δημιουργεί δύο χρωμόσωματα χωρίς τελομερή. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι BFB οδηγούν σε γονιδιακή ενίσχυση. Η διαδικασία αυτή δημιουργεί HSRs αλλά και double minutes [136].

1.8.3 Γονιδιακή ενίσχυση μέσω του μηχανισμού FoSTeS

Ένας ακόμα μηχανισμός πρόκλησης γονιδιακής ενίσχυσης περιλαμβάνει το σταμάτημα των αντιγραφικών θηλιών και την αλλαγή υποστρώματος, διαδικασία γνωστή και ως FoSTeS (fork stalling and template switching). Το μοντέλο αυτό, το οποίο παρουσιάζεται στην εικόνα 1.16, στηρίζεται στο σταμάτημα των αντιγραφικών θηλιών που συμβαίνει στα κύτταρα υπό συνθήκες αντιγραφικού στρες. Περιεγράφηκε πρώτη φορά από τους Slack, Thornton, Magner, Rosenberg, και Hastings το 2006 ως πιθανός μηχανισμός γονιδιακής ενίσχυσης έπειτα από αντιγραφικό στρες *Escherichia coli* [143]. Η διαδικασία FoSTeS ξεκινάει με το σταμάτημα των αντιγραφικών θηλιών λόγω αντιγραφικού στρες ή εξαιτίας κάποιας δευτεροταγούς δομής στο DNA που εμποδίζει την αντιγραφή. Στο σημείο που γίνεται η παύση το 3' ελεύθερο άκρο του νεοσυντιθέμενου κλώνου που καθυστερεί μπορεί να απομακρυνθεί από τη σημείο σύνθεσης και να υβριδοποιηθεί σε γειτονική θηλιά με την αλληλουχία της οποίας παρουσιάζει μικρή ομολογία (microhomology mh). Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί έως ότου ο κλώνος επιστρέψει στο αρχικό του υπόστρωμα συνεχίζοντας την αντιγραφή μέχρι το τέλος του χρωμοσώματος. Ο μηχανισμός αυτός προκαλεί σχετικά μικρό αριθμό αντιγράφων των οποίων η διάταξη στο γονιδίωμα είναι μη επαναλαμβανόμενη.



Εικόνα 1.16 Μοντέλο γονιδιακής ενίσχυσης μέσω FoSTeS. Α) Το αντιγραφικό στρες ή η ύπαρξη διπλής θραύσης στο DNA προκαλεί σταμάτημα της αντιγραφικής διχάλας. **Β)** Ο κλώνος που καθυστερεί μπορεί να απομακρυνθεί από το σημείο σύνθεσης και να εισχωρήσει σε μία γειτονική ενεργή αντιγραφική θηλιά και να υβριδοποιηθεί σε μία περιοχή με την οποία παρουσιάζει μικρή ομολογία (κόκκινο). **Γ)** Ο κλώνος που καθυστερεί αποδεσμεύεται και πάλι και υβριδοποιείται σε νέα περιοχή που παρουσιάζει μικρή ομολογία (μωβ). **Δ)** Ο κλώνος επιστρέφει στο αρχικό του υπόστρωμα όπου και συνεχίζει την αντιγραφή μέχρι το τέλος του χρωμοσώματος [144].

1.9 Γονιδιακή ενίσχυση και καρκινογένεση

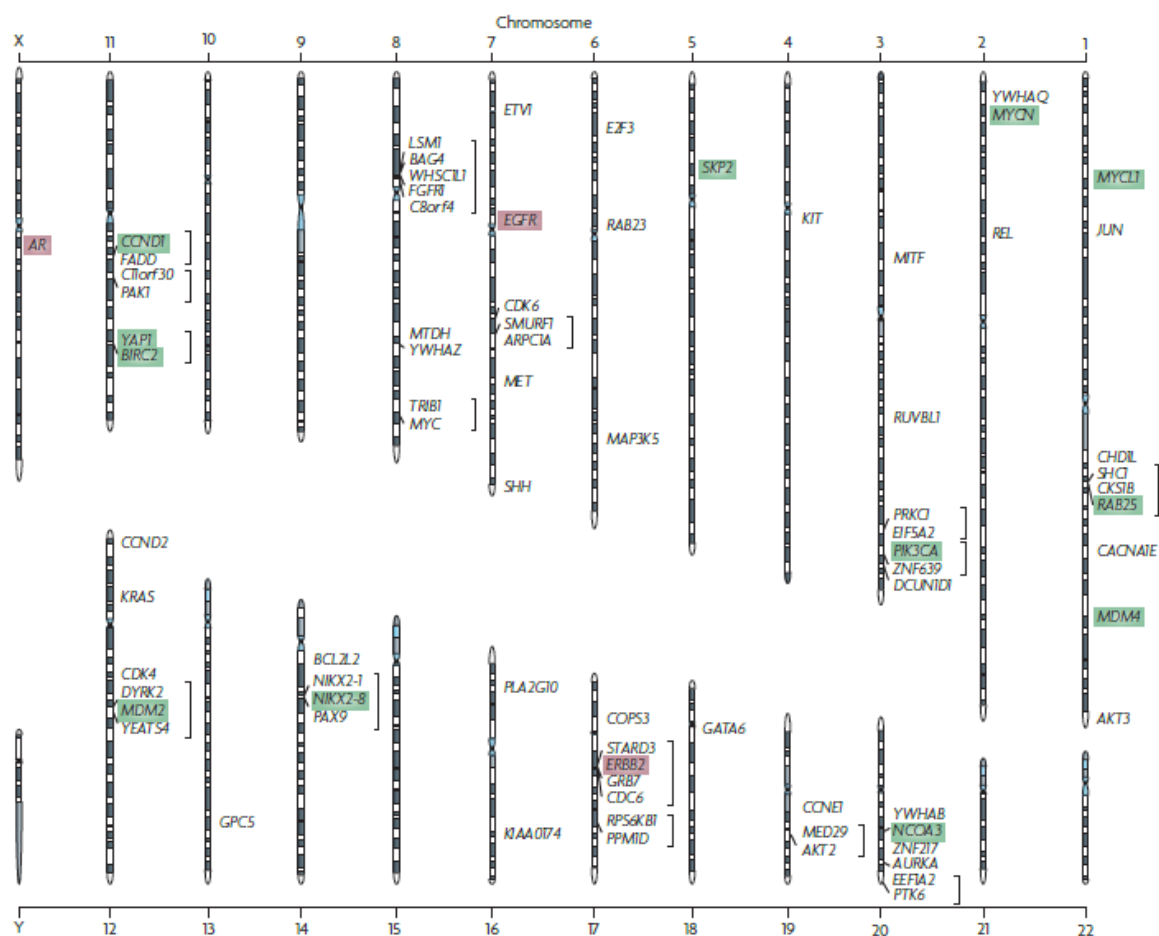
Η γονιδιακή ενίσχυση αποτελεί συχνή αλλοίωση του γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων, ενώ θεωρείται ότι συμβάλει και στην εξέλιξη του καρκίνου [127, 145, 146]. Οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων μπορεί να εκδηλώνονται είτε ως double minutes είτε ως HSRs, αλλά και να εμφανίζονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα των κυττάρων. Πολλές από τις ενισχυμένες περιοχές που έχουν βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα περιλαμβάνουν ογκογονίδια όπως για παράδειγμα τα γονίδια MYC, MYCN, ERBB2 (HER-2/neu) και ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR) [147, 148]. Το γονίδιο MYC ήταν το πρώτο που δείχθηκε ότι εμφανίζει ενίσχυση σε αρκετούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως το καρκίνωμα παχέος εντέρου, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα και το οστεοσάρκωμα. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), έγινε δυνατή η καλύτερη μελέτη των γονιδιωμάτων των καρκινικών κυττάρων και η ανίχνευση μεταλλαγών όπως δομικές αλλαγές (Structural Variations, SVs) και αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων (Copy Number Variations, CNVs). Η ανάλυση αυτή έδωσε τη δυνατότητα αναγνώρισης περιοχών που σχετίζονται σημαντικά με την εμφάνιση CNV και την ανακάλυψη νέων υποψήφιων ογκογονιδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι [149].

Η περιοχή 17q12-q21 αποτελεί μια από τις πιο καλά μελετημένες περιοχές του χρωμοσώματος 17 που υπόκεινται σε ενίσχυση. Η συγκεκριμένη περιοχή περιλαμβάνει μια σειρά από γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, καθώς και το γονίδιο ERBB2 το οποίο αποτελεί σημαντικό «οδηγό» ογκογονίδιο στον καρκίνο του μαστού. Η ενίσχυση του γενετικού τόπου ERBB2 συμβαίνει σε ένα 10-34% των ασθενών με καρκίνο του μαστού και αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την υποτροπή και την επιβίωση των ασθενών [123, 150]. Η πρωτεΐνη Erbb2 αποτελεί μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη. Ενίσχυση του αντίστοιχου γενετικού τόπου οδηγεί σε ετεροδιμερισμό του Erbb2 με άλλα μέλη της EGFR οικογένειας. Το ετεροδιμερές που δημιουργείται ενεργοποιεί μονοπάτια πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των κυττάρων οδηγώντας στην καρκινογένεση [151, 152]. Επομένως η πρωτεΐνη Erbb2 αποτελεί στόχο για αντικαρκινικούς παράγοντες. Το Trastuzumab (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Erbb2) αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά αντικαρκινικά σκευάσματα που στοχεύουν την εξωκυτταρική υπομονάδα του υποδοχέα ERBB2, και εμφανίζει

αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με υπερέκφραση ή/και γονιδιακή ενίσχυση του ERBB2 [153].

Εκτός από το ογκογονίδιο ERBB2, η περιοχή 17q12-q21 περιλαμβάνει και άλλα γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση όπως το STARD3, το EGFR και την DNA τοποϊσομεράση 2α. Ο EGFR ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων με δράση κινάσης τυροσίνης ErbB και παίζει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων. Σε ασθενείς με πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα, η υπερέκφραση και ενίσχυση του EGFR σχετίζεται με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης [154]. Ο EGFR αποτελεί στόχο αντικαρκινικών φαρμάκων όπως τα gefitinib και erlotinib. Πρόκειται για αναστολείς της δράσης κινάσης τυροσίνης που αναστέλλουν τη σηματοδότηση μέσω του EGFR [155].

Το γονίδιο της κυκλίνης D1 (CCND1) βρίσκεται στην περιοχή 11q13 του χρωμοσώματος 11 και εμφανίζεται ενισχυμένο σε αρκετούς τύπους καρκίνου όπως του μαστού και του πνεύμονα [156]. Η κυκλίνη D1 σχηματίζει σύμπλοκο με την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 4 ή 6 και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (RB) πυροδοτώντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S του κυτταρικού κύκλου [157]. Στον καρκίνο του μαστού, το 15-20% των όγκων παρουσιάζουν ενίσχυση του γονιδίου CCND1 [158].



Εικόνα 1.17 Σχηματική αναπαράσταση των χρωμοσωμάτων καθώς και οι θέσεις των γονιδίων που παρουσιάζουν ενίσχυση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Με ροζ απεικονίζονται τα γονίδια που σχετίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό με την καρκινογένεση και με πράσινο τα γονίδια που θεωρούνται ότι συμμετέχουν δευτερογενώς.

1.10 Γονιδιακή ενίσχυση και ανθεκτικότητα σε αντικαρκινικά φάρμακα

Εκτός από τις κοινές μεθόδους θεραπείας του καρκίνου, όπως οι χειρουργικές επεμβάσεις, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία, έχουν αναπτυχθεί και στοχευμένες θεραπείες βασισμένες στη καλύτερη κατανόηση της βιολογίας και της γενετικής πίσω από την εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, η χημειοθεραπεία εξακολουθεί να αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες επιλογές για τη θεραπεία του καρκίνου. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποτυχίας των χημειοθεραπειών οφείλεται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντικαρκινικά φάρμακα. Η ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να είναι είτε εγγενής είτε επίκτητη [153]. Ένας από τους βασικούς παράγοντες που οδηγούν

σε ανθεκτικότητα αποτελεί η ετερογενής φύση των καρκινικών όγκων. Σε όγκους που χαρακτηρίζονται από υψηλή ετερογένεια, η θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα λειτουργεί ως περιβαλλοντική πίεση που ευνοεί την επιλογή μικρών ανθεκτικών υποπληθυσμών που πιθανά προϋπήρχαν [159, 160].

Η γονιδιακή ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων των φαρμάκων αποτελεί έναν μηχανισμό απόκτησης ανθεκτικότητας που συναντάται σε ένα 10% των καρκίνων, κυρίως των λευχαιμιών. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στη μεθοτρεξάτη αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ανθεκτικότητας μέσω ενίσχυσης. Η μεθοτρεξάτη αποτελεί ανταγωνιστή του φολικού οξέος και αναστέλλει το ένζυμο διϋδροφολική αναγωγή (DHFR) το οποίο φυσιολογικά καταλύει την αναγωγή του διϋδροφολικού σε τετραϋδροφολικό οξύ. Αναστολή της λειτουργίας του έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων τετραϋδροφολικού οξέος στα κύτταρα με επακόλουθη αναστολή της σύνθεσης των πουρινών και πυριμιδινών. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αδυναμία σύνθεσης DNA και RNA από τα κύτταρα, τα οποία οδηγούνται σε απόπτωση [161]. Ενίσχυση του γενετικού τόπου που περιλαμβάνει το γονίδιο DHFR προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι της μεθοτρεξάτης. Άλλα παραδείγματα συσχέτισης γονιδιακής ενίσχυσης και ανθεκτικότητας αποτελούν ο υποδοχέας EGFR και τα αντικαρκινικά φάρμακα Gefitinib και Erlotinib [155] καθώς και το γονίδιο BCR-ABL ενίσχυση του οποίου προσδίδει ανθεκτικότητα στο φάρμακο imatinib [162].

Η γονιδιακή ενίσχυση αποτελεί ένα βασικό μηχανισμό της καρκινογένεσης. Αρχικά, η ενίσχυση γενετικών τόπων που περιλαμβάνουν ογκογονίδια επιφέρει την υπερέκφραση και ενεργοποίηση αυτών, συμβάλλοντας στην κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων. Επιπλέον, η ενίσχυση γονιδίων που αποτελούν στόχους αντικαρκινικών φαρμάκων συμβάλει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτά και κατ' επέκταση τη διατήρηση και εξέλιξη της νόσου. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι η μελέτη της γονιδιακής ενίσχυσης ογκογονιδίων είναι πολύ σημαντική για την ανακάλυψη συνδυαστικών και αποτελεσματικών θεραπειών που στοχεύουν σε εξειδικευμένους στόχους.

2. Σκοπός

Η αντιγραφή του DNA είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται αυστηρά από πολλαπλούς μηχανισμούς ελέγχου προκειμένου να διασφαλιστεί η ακέραιη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στις επόμενες γενιές. Απώλεια των μηχανισμών αυτών οδηγεί σε επαναντιγραφή του γονιδιώματος και σε γονιδιωματική αστάθεια. Στον σχιζοσακχαρομύκητα (*Schizosaccharomyces pombe*), η υπερέκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα Cdc18/Cdc6 επαρκεί για την επαγωγή ανομοιομόρφης επαναντιγραφής κατά μήκος του γονιδιώματος. Προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου που αναπαριστά τη διαδικασία της επαναντιγραφής του DNA. In silico ανάλυση, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων υποδεικνύει την ύπαρξη ετερογένειας που οδηγεί σε πληθώρα διαφορετικών γονοτύπων καθώς και την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος οι οποίες επηρεάζουν τα επίπεδα επαναντιγραφής των περιοχών αυτών.

Επαναντιγραφή του γονιδιώματος λόγω απορρύθμισης του μηχανισμού αδειοδότησης έχει παρατηρηθεί και σε κύτταρα θηλαστικών, ενώ έχει δείχθει ότι συμβάλλει στην κακοήγη εξαλλαγή τους. Η γονιδιακή ενίσχυση αποτελεί μια μορφή γονιδιωματικής αστάθειας που μπορεί να οφείλεται στην επαναντιγραφή του DNA. Το φαινόμενο της γονιδιακής ενίσχυσης εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων προάγοντας την καρκινογένεση. Επιπλέον αποτελεί ένα μηχανισμό εμφάνισης ανθεκτικότητας σε αντικαρκινικά φάρμακα συμβάλλοντας έτσι και στη διατήρηση της νόσου.

Στόχος της παρούσας πρότασης είναι η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην επαναντιγραφή του DNA καθώς επίσης και η μελέτη της ετερογένειας του φαινομένου, χρησιμοποιώντας ως οργανισμό μοντέλο τον *S.pombe*. Συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια διερεύνησης καινούριων μορίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της επαναντιγραφής με πειράματα γενετικής σάρωσης. Επιπλέον, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων μελετήθηκε η ετερογένεια της επαναντιγραφής με μεθόδους μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας, ενώ σε επίπεδο πληθυσμού διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος παραγόντων στη ρύθμιση της επαναντιγραφής των τελομερών. Στη συνέχεια μελετήθηκε η συσχέτιση της επαναντιγραφής με το φαινόμενο της γονιδιακής ενίσχυσης. Η μελέτη αυτή έγινε με τη χρήση δεδομένων υψηλής απόδοσης που είναι διαθέσιμα

μέσω της βάσης TCGA και αφορούν σε δείγματα ασθενών με διαφόρους τύπους καρκίνου. Τέλος διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση της γονιδιακής ενίσχυσης με μονοπάτια απόκρισης στη βλάβη καθώς και με τα δύο κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης της βλάβης, τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination, HR) και τη μη ομόλογη ένωση άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ)

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Φυσιολογία και Γενετική του σχιζοσακχαρομύκητα *S. Pombe*

3.1.1 Ονοματολογία γονιδίων και πρωτεϊνών

Στην παρούσα διατριβή, η ονομασία των στελεχών *S.pombe* έγινε σύμφωνα με τον οδηγό ονοματολογίας των Kohli και Nurse [163]. Για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν τρία πεζά γράμματα σε πλάγια γραφή. Τα αγρίου τύπου αλληλόμορφα ακολουθούνται από το σύμβολο «+» (πχ. *leu1+*), ενώ τα αλληλόμορφα που περιέχουν μεταλλάξεις ακολουθούνται από συνδυασμό γραμμάτων και αριθμών που διαχωρίζεται από το όνομα του γονιδίου με παύλα (πχ. *leu1-32*). Για τις απαλοιφές γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το γράμμα «Δ» (πχ. *his7Δ*). Στις περιπτώσεις αντικατάστασης ενός γονιδίου από κάποιο άλλο, χρησιμοποιήθηκε το όνομα του γονιδίου που απαλείφθηκε ακολουθούμενο από το σύμβολο «::» και το όνομα του γονιδίου ή της αλληλουχίας που το αντικατέστησε (πχ. *lys1+::lacO*). Για την περιγραφή του συζευκτικού τύπου των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τα σύμβολα h+ και h-.

Για τις πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο όνομα με αυτό των γονιδίων που τις κωδικοποιούν χωρίς πλάγια γραφή και με το πρώτο από τα τρία γράμματα, κεφαλαίο. Για τα γονίδια τα οποία εκφράζονται επισωμικά από πλασμίδια, ο χαρακτήρας «p» και το όνομα του πλασμιδίου προηγούνται του ονόματος του γονιδίου (πχ. pDUAL2-*rif1*).

3.1.2 Καλλιέργεια του *Schizosaccharomyces pombe*

Οι πίνακες που ακολουθούν περιγράφουν τη σύσταση των θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του σχιζοσακχαρομύκητα, καθώς και των επιμέρους διαλυμάτων που χρειάζονται για την παρασκευή τους.

Πίνακας 3.1: Σύσταση υγρού θρεπτικού μέσου YE

	Τελική Συγκέντρωση
Yeast extract	0,5% w/v
Γλυκόζη	3% w/v

Πίνακας 3.2: Σύσταση υγρού θρεπτικού μέσου EMM (Edinburgh Minimal Medium)

	Τελική Συγκέντρωση
Potassium hydrogen phthallate	14.7 mM
Na ₂ HPO ₄	15.5 mM
NH ₄ CL	93.5 mM
Γλυκόζη	2% w/v
Άλατα	1x
Βιταμίνες	1x
Ιχνοστοιχεία	1x

Πίνακας 3.3: Σύσταση διαλύματος αλάτων (50x)

	Τελική Συγκέντρωση
Mg•6H ₂ O	0,26 M
CaCl ₂ •2H ₂ O	4,99 mM
KCL	0.67 M
Na ₂ SO ₄	14.1 mM

Πίνακας 3.4: Σύσταση διαλύματος βιταμινών (1000x)

	Τελική Συγκέντρωση
Pantothenic acid	4.20 mM
Nicotinic acid	81.2 mM
Inositol	55.5 mM
Biotin	40.8 μM

Πίνακας 3.5: Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων (10000x)

	Τελική Συγκέντρωση
Boric acid	80.9 mM
MnSO₄	23.7 mM
Zn•7H₂O	13.9 mM
FeCl₂•6H₂O	7.40 mM
Molybdic acid	2.47 mM
KI	6.02 mM
CuSO₄•5H₂O	1.60 mM
Citric acid	47.6 mM

Πίνακας 3.6: Σύσταση στερεού θρεπτικού μέσου SPAS

	Τελική Συγκέντρωση
KH₂PO₄	7.3 mM
Γλυκόζη	1% w/v
Βιταμίνες	1x
Άγαρ	3% w/v

Για την παρασκευή στερεών θρεπτικών EMM και YE προστίθεται 2% w/v άγαρ καθώς επίσης και αδενίνη, ιστιδίνη, ουρακίλη, λευκίνη και λυσίνη σε συγκέντρωση 225 mg/L το καθένα. Στο θρεπτικό SPAS η τελική συγκέντρωση των αμινοξέων, της ουρακίλης και της αδενίνης είναι 45 mg/L.

3.1.3 Κατασκευή νέων στελεχών *Schizosaccharomyces pombe*

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 3.7:Στελέχη *Schizosaccharomyces pombe*

ZP151	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18-d55</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP152	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm141x-cdc18-d55</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP153	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP269	<i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18-d55</i> , <i>leu1+</i>), <i>ade3::</i> [<i>kanr-ura4+-LacO</i>], <i>his7+::</i> LacI-GFP, <i>ura4-D18</i>
ZP295	<i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18-d55</i> , <i>leu1+</i>), <i>lys1+::</i> LacO, <i>his7+::</i> LacI-GFP, ChrI 1,5Mb::TetO-hphMX, Z locus::TetR-tdTomato-natMX, <i>ura4-D18</i> , <i>ade6-M210</i>
ZP326	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), (pDUAL2-GFH- <i>nm1-rif1</i> , <i>ura4+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP327	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), (pDUAL2-GFH- <i>nm1-rad3</i> , <i>ura4+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP328	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), (pDUAL2-GFH- <i>nm1-taz1</i> , <i>ura4+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP329	<i>h-</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), (pDUAL2-GFH- <i>nm1-dfp1</i> , <i>ura4+</i>), <i>ura4-D18</i>
ZP345	<i>h+</i> , <i>ura4-D18</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>tel1Δ::</i> kanMX4
ZP360	<i>h+</i> , <i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>tel1Δ::</i> kanMX4
ZP374	<i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>tel1Δ::</i> kanMX4 (pDUAL2-GFH- <i>nm1-rif1</i> , <i>ura4+</i>)
ZP375	<i>leu1-32::</i> (<i>nm13x-cdc18</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>tel1Δ::</i> kanMX4 (pDUAL2-GFH- <i>nm1-taz1</i> , <i>ura4+</i>)
ZP510	<i>h+</i> , <i>leu1-32</i> , <i>his3-D1</i>
ZP517	<i>leu1-32::</i> (<i>nm141x-cdc18-d55</i> , <i>leu1+</i>), <i>ura4-D18</i> , <i>leu1-32</i> , <i>his3-D1</i>

Η κατασκευή των στελεχών ZP360 και ZP517 πραγματοποιήθηκε με διασταυρώσεις. Το στέλεχος ZP360 προέκυψε από διασταύρωση των ZP153 και ZP345 ενώ το στέλεχος ZP517 από διασταύρωση των ZP152 και ZP510. Ακολούθησε ανάλυση

μειωτικών προϊόντων (Random Spore Analysis) για την εύρεση των αποικιών με τον επιθυμητό γονότυπο. Η κατασκευή των στελεχών ZP326-329 έγινε με μετασχηματισμό του στελέχους ZP153 με τα πλασμίδια pDUAL2-GFH-nmt1-*rif1*, pDUAL2-GFH-nmt1-*rad3*, pDUAL2-GFH-nmt1-*taz1*, pDUAL2-GFH-nmt1-*dfp1* αντίστοιχα.

Διασταύρωση στελεχών

Η σύζευξη και η διασταύρωση γίνεται μεταξύ δυο ετεροθαλικών σειρών σε συνθήκες στέρησης θρεπτικών ουσιών. Ίσες ποσότητες κυττάρων από τα δύο στελέχη αναμειγνύονται σε αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια σταγόνες του μίγματος τοποθετούνται σε θρεπτικό μέσο SPAS. Το τρυβλίο επωάζεται για 3-4 ημέρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 30°C προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύζευξη και να δημιουργηθούν ασκοί με σπόρια.

Ανάλυση μειωτικών προϊόντων (Random Spore Analysis)

Αφού πραγματοποιηθεί η διασταύρωση των στελεχών και δημιουργηθούν ασκοί με σπόρια ακολουθεί η ανάλυση των μειωτικών προϊόντων. Αρχικά, 1ml αποστειρωμένου νερού εμβολιάζεται με κύτταρα από μία διασταύρωση τριών ημερών. Στο διάλυμα προστίθενται 2μl ενζύμου H.P.J (Helix Pomatia Juice) και ακολουθεί επώαση για τουλάχιστον 6 ώρες στους 29°C. Στη συνέχεια τα σπόρια στρώνονται σε στερεό πλούσιο θρεπτικό (YES) και επωάζονται στους 32°C μέχρι να σχηματιστούν αποικίες. Οι αποικίες αυτές ελέγχονται ως προς τις αυξοτροφίες τους προκειμένου να βρεθούν μειωτικοί απόγονοι με τον επιθυμητό γονότυπο.

Μετασχηματισμός κυττάρων *S.pombe* με πλασμίδιο

Για το μετασχηματισμό κυττάρων *S.pombe* με πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- 50ml καλλιέργειας κυττάρων *S.pombe* (σε υγρό θρεπτικό EMM και συγκέντρωση 1×10^7 κύτταρα/ml) φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 4000rpm.

- Πλύση του ιζήματος με 50ml αποστειρωμένου ddH₂O.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1ml ddH₂O και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4.000rpm προκειμένου να απομακρυνθεί το υπερκείμενο.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1ml LiAc-TE και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4.000rpm
- Ακολουθεί επαναδιάλυση κυττάρων σε 250μl LiAc-TE και μεταφορά 100μl σε σωληνάκια Eppendorf (1,5ml).
- Αποδιάταξη herring sperm DNA (10 mg/ mL) με θέρμανση στους 100 °C για 5 λεπτά και κατευθείαν τοποθέτηση στον πάγο.
- Προσθήκη 2μl herring sperm DNA σε κάθε αντίδραση μετασχηματισμού.
- Στο ένα από τα δύο σωληνάκια προστίθεται το πλασμίδιο (1-2μg), ενώ το δεύτερο σωληνάκι χρησιμοποιείται ως δείγμα αρνητικού ελέγχου.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε κάθε σωλήνα Eppendorf μεταφέρονται 260 μl διαλύματος 40% PEG/ LiAc-TE.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 29°C για 60 λεπτά.
- Σε κάθε αντίδραση μετασχηματισμού προστίθενται 43μl DMSO που έχει επωαστεί στους 29°C προηγουμένως για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί θερμικό πλήγμα στους 42°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4.000rpm.
- Ακολουθεί πλύση του ιζήματος των κυττάρων σε 1ml ddH₂O, φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4.000rpm και επαναιώρηση σε 500 μl ddH₂O.
- Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού στρώνονται από 250μl σε δύο τρυβλία με κατάλληλο επιλεκτικό μέσο.

Πίνακας 3.8: Διαλύματα μετασχηματισμού

	Τελική Συγκέντρωση
LiAc-TE	0.1 M lithium acetate pH4.9
	10mM Tris pH 7.5
	1 mM EDTA
LiAc-TE-PEG	LiAc-TE
	40% v/v PEG ₄₀₀₀

Μετασχηματισμός κυττάρων *S.pombe* με γονιδιωματική βιβλιοθήκη

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε έχει ως βάση το φορέα κλωνοποίησης pBG2. Ο φορέας αυτός φέρει ένα τμήμα του γονιδιώματος που περιλαμβάνει το γονίδιο *his3+* και βρίσκεται εκατέρωθεν των θέσεων περιορισμού EcoRV/DraI. Ωστόσο το τμήμα αυτό είναι ικανό να οδηγήσει σε ανάπτυξη του στελέχους απουσία ιστιδίνης μόνο αν βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα [164]. Για την κατασκευή της βιβλιοθήκης, το γονιδίωμα του *S.pombe* τεμαχίστηκε με το ένζυμο *Sau3AI*. Τα τμήματα DNA που προέκυψαν στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με το ένζυμο *PolIK* παρουσία dGTP και dATP με αποτέλεσμα τη δημιουργία μονόκλωνων 5' άκρων GA τα οποία δεν είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους αποτρέποντας έτσι την ένθεση δύο τμημάτων στο ίδιο μόριο του φορέα κλωνοποίησης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε κατάτμηση του φορέα pBG2 με το περιοριστικό ένζυμο *SalI* και ακολούθησε επεξεργασία με το ένζυμο *PolIK* παρουσία dCTP και dTTP με σκοπό τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων με αλληλουχία TC. Η δημιουργία της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης των παραπάνω τμημάτων DNA. Η βιβλιοθήκη αποτελείται από 2×10^6 περίπου κλώνους οι οποίοι περιέχουν ως ένθεμα τμήματα του γονιδιώματος του *S.pombe* το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 2-10kb [165].

Για το μετασχηματισμό κυττάρων *S.pombe* με γονιδιωματική βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό πρωτόκολλο το οποίο δίνει αυξημένη απόδοση μετασχηματισμού. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- 10ml καλλιέργειας κυττάρων *S.pombe* (σε υγρό θρεπτικό EMM και συγκέντρωση 1×10^7 κύτταρα/ml) φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 3000rpm.
- Πλύση του ιζήματος με 10ml αποστειρωμένου ddH₂O.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1ml ddH₂O και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4.000rpm
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναιώρηση κυττάρων σε 100μl 0.1M lithium acetate (pH4.9).
- Επώαση των κυττάρων στους 30°C για 60-120 λεπτά.
- Προσθήκη 2-5μg της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε 15μl TE (pH7.5) με ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη 290μl 50% w/v PEG₄₀₀₀ η οποία έχει προθερμαθεί στους 30°C.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 30°C για 60 λεπτά.

- Θερμικό πλήγμα στους 43°C για 15 λεπτά και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά στις 5000rpm, αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναιωρούνται σε 1ml υγρού θρεπτικού ΥΕ.
- Το 1ml κυττάρων προστίθεται σε 9ml υγρού θρεπτικού ΥΕ σε κωνικές φιάλες των 50ml και οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση στους 32°C για 60 λεπτά.
- Οι καλλιέργειες στρώνονται σε τρυβλία με κατάλληλο επιλεκτικό μέσο.

3.1.4 Επαγωγή έκφρασης γονιδίων κάτω από των έλεγχο του *nmt* υποκινητή

Ο υποκινητής *nmt* προέρχεται από το γονίδιο του *nmt1+* το οποίο εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της θειαμίνης και αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα έκφρασης γονιδίων στον *S.pombe*. Παρουσία θειαμίνης στο θρεπτικό προκαλεί καταστολή του υποκινητή και της έκφρασης του γονιδίου. Η απομάκρυνση της θειαμίνης πυροδοτεί την ενεργοποίηση του υποκινητή και την υπερέκφραση του γονιδίου που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του, μέσα σε 16-18 ώρες. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι υποκινητών *nmt* που διαφέρουν ως προς την ισχύ τους. Ισχυρότερος όλων είναι ο *nmt1* και ακολουθούν οι *nmt41* (ή *nmt**) και *nmt81* (ή *nmt***) [166].

Τα στελέχη που περιέχουν γονίδια κάτω από το έλεγχο υποκινητών *nmt* μεγαλώνουν και διατηρούνται σε τρυβλία που περιέχουν 5μg/ml θειαμίνη (Τ). Για την επαγωγή των γονιδίων αυτών σε υγρή καλλιέργεια, τα κύτταρα αρχικά καλλιεργούνται σε θρεπτικό με θειαμίνη μέχρι την εκθετική τους φάση ($OD_{500} \sim 0.5$). Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στις 3000rpm και ακολουθούν τρεις πλύσεις με θρεπτικό που δεν περιέχει θειαμίνη. Έπειτα επαναιωρούνται σε υγρό θρεπτικό και καλλιεργούνται απουσία θειαμίνης.

3.1.5 Ανάλυση περιεχομένου DNA με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Για τον προσδιορισμό του περιεχομένου DNA σε κύτταρα *S.pombe* χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ιωδιούχο προπίδιο (Propidium iodide, PI) και ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων είναι τα εξής:

- Όγκος καλλιέργειας που περιέχει $\sim 10^7$ κύτταρα φυγοκεντρείται στις 2000rpm για 5 λεπτά.
- Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml ddH₂O και επαναιώρηση σε 1ml 70% αιθανόλης.

Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους 4°C. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων γίνεται η χρώση τους με ιωδιούχο προπίδιο σύμφωνα με τα εξής βήματα:

- 300μl από το μονιμοποιημένο δείγμα φυγοκεντρείται και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Ακολουθεί ενυδάτωση των δειγμάτων με επαναδιάλυση σε 1ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 50mM.
- Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του ιζήματος που περιέχει τα κύτταρα σε 0.5ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 50mM και προσθήκη RNase A σε τελική συγκέντρωση 0.1mg/ml.
- Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 2 ώρες.
- Ακολουθεί προσθήκη 0.5ml κιτρικού νατρίου (50mM) στο οποίο περιέχεται η χρωστική ιωδιούχο προπίδιο σε τελική συγκέντρωση 2μg/ ml.

3.1.6 Ενζυμική λύση κυτταρικού τοιχώματος κυττάρων *S.pombe*

Τα κύτταρα του σχιζοσακχαρομύκητα διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται κατά κύριο λόγο από πολυσακχαρίτες και γαλακτομαννοπρωτεΐνες. Η λύση του κυτταρικού τοιχώματος οδηγεί στη δημιουργία σφαιρικών κυττάρων που ονομάζονται σφαιροπλάστες. Για την ενζυμική λύση του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων *S.pombe* ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Καλλιέργεια κυττάρων μέχρι $OD_{595} \sim 0.2 - 0.5$ σε θρεπτικό EMM που περιέχει 0.5% γλυκόζη.
- Φυγοκέντρηση 5ml καλλιέργειας στις 2000rpm για 5 λεπτά και επαναδιάλυση ιζήματος σε 1ml διαλύματος Α.
- Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 500μl διαλύματος Β.
- Επώαση στους 30°C για 15-30 λεπτά μέχρι να σχηματιστούν σφαιροπλάστες.
- Προσθήκη 3.5ml διαλύματος Γ και φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά.
- Έκπλυση ιζήματος με 1ml διαλύματος Γ.
- Επαναδιάλυση Ιζήματος σε 1ml διαλύματος Γ.

Πίνακας 3.9 Σύσταση διαλυμάτων Α-Γ

	Συγκέντρωση
Διάλυμα Α:	
Citrate/Phospate pH5.6	20mM
EDTA pH8.0	40mM
Διάλυμα Β:	
Citrate/Phospate pH5.6	50mM
KCl	0.6M
Lysing enzymes	1mg/ml
Διάλυμα Γ	
Tris-HCl pH 7.6	10mM
KCl	0.6M

3.2 Μοριακές Τεχνικές

3.2.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Η καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται κάτω από στείρες συνθήκες ως εξής.

- Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού LB που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό με μία μοναδιαία αποικία.
- Η επώαση των καλλιεργειών γίνεται στους 37°C υπό ανάδευση.

Οι όγκοι των καλλιεργειών μικρής και μεσαίας κλίμακας είναι 3ml και 200ml αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100μg/ml. Η σύσταση του υγρού θρεπτικού LB περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.10: Συστατικά υγρού θρεπτικού LB

Συστατικά	
Bacto-tryptone	10gr
Bacto-yeast extract	5gr
NaCl	10gr
ddH ₂ O	950ml

Το pH του θρεπτικού ρυθμίζεται στο 7 και ακολουθεί ογκομέτρηση σε τελικό όγκο 1lt και αποστείρωση. Για την παρασκευή στέρεου θρεπτικού LB-άγαρ ακολουθούμε την ίδια διαδικασία και μετά τη ρύθμιση το pH προστίθενται 15gr άγαρ/lt LB.

3.2.2 Κατασκευή πλασμιδίων υπερέκφρασης.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή καθώς και αυτά που κατασκευάστηκαν, παρουσιάζονται στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα:

Πίνακας 3.11: Λίστα πλασμιδίων

Φορέας κλωνοποίησης	Ένθεμα
pDONR201	rif1
pDONR201	taz1
pDUAL2-GFH1c	-
pDUAL2-GFH1c	rif1
pDUAL2-GFH1c	taz1

Η κατασκευή των πλασμιδίων pDUAL2-GFH1c με τα γονίδια rif1 και taz1 ως ενθέματα επιτυγχάνεται συνοπτικά μέσα από τα εξής βήματα:

- LR αντίδραση ανασυνδυασμού μεταξύ των πλασμιδίων pDONR201 που περιλαμβάνουν τα ενθέματα και του πλασμιδίου pDUAL2- GFH1c.
- Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων stb13 με το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης.
- Επιστροφή των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλία που περιέχουν LB-άγαρ και αμπικιλίνη, για την ανάπτυξη μοναδιαίων αποικιών. Επώαση στους 37°C, για 16 ώρες.
- Εμβολιασμός, μερικών από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία αμπικιλίνης και ανάπτυξη των καλλιεργειών 37°C, για 16 ώρες.
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (μικρής κλίμακας). Πέψεις και ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων, ώστε να βρεθούν οι κλώνοι που φέρουν το επιθυμητό ένθεμα. 1-2 θετικοί κλώνοι επιστρώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ παρουσία αμπικιλίνης και επωάζονται στους 37°C, για 16 ώρες.
- Εμβολιασμός 1-2 αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αμπικιλίνης και ανάπτυξη των καλλιεργειών (μεσαίας κλίμακας) στους 37°C, για 16 ώρες.
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (μεσαίας κλίμακας). Πέψεις και ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι οι κλώνοι που επιλέχθηκαν φέρουν το επιθυμητό ένθεμα.

3.2.3 Αντίδραση ανασυνδυασμού LR

Η τεχνολογία Gateway αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο κλωνοποίησης. Επιτρέπει τη μεταφορά τμημάτων DNA από έναν πλασμιδιακό φορέα, στον τελικό φορέα κλωνοποίησης, εκμεταλλευόμενη το σύστημα ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λ. Ο αρχικός πλασμιδιακός φορέας (στην προκειμένη περίπτωση pDONR201) φέρει τις αλληλουχίες attL1 και attL2 εκατέρωθεν του ενθέματος. Ο τελικός φορέας pDUAL2-GFH1c περιλαμβάνει τις αλληλουχίες attR1 και attR2. Κατά την αντίδραση LR πραγματοποιείται ανασυνδυασμός μεταξύ των θέσεων attL και attR με αποτέλεσμα τη μεταφορά του ενθέματος από τον pDONR201 στον τελικό φορέα pDUAL2-GFH1c. Τα βήματα της αντίδρασης είναι τα εξής:

Πίνακας 3.12: Συστατικά αντίδρασης LR

Συστατικά ανά αντίδραση LR	
Αρχικό πλασμίδιο (pDONR201)	150ng
Τελικό πλασμίδιο (pDUAL2-FGH1c)	150ng
LR clonase II enzyme mix	2μl
TE buffer pH8.0	Μέχρι τελικό όγκο 8μl

- Ξεπάγωμα του LR clonase II enzyme mix σε πάγο για 2 λεπτά.
- Σύντομη ανάδευση με vortex 2 φορές από 2 δευτερόλεπτα.
- Σε κάθε αντίδραση που περιλαμβάνει τα δύο πλασμίδια και το TE buffer, προστίθενται 2μl LR clonase II enzyme mix.
- Σύντομη ανάδευση με vortex 2 φορές από 2 δευτερόλεπτα.
- Επώαση στους 25°C για 16 ώρες.
- Τερματισμός της αντίδρασης με προσθήκη 1 μl πρωτεΐνης K ανά αντίδραση και επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
- Η αντίδραση φυλάσσεται στους -20°C.

3.2.4 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων Stbl3

Δεκτικά βακτήρια Stbl3 (Invitrogen) μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR. Τα πλασμίδια αυτά διαθέτουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, επομένως επιλέχθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα Stbl3 τα οποία έχουν

μειωμένη ικανότητα ομόλογου ανασυνδυασμού. Η διαδικασία μετασχηματισμού γίνεται κάτω από στείρες συνθήκες και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού χρησιμοποιούνται 30μl δεκτικών βακτηρίων Stbl3 και 1μl από την αντίδραση LR.
- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Θερμικό πλήγμα για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C.
- Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 250μl SOC σε κάθε αντίδραση.
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.
- Επιστροφή 100μl σε τρυβλία LB-άγαρ παρουσία αμπικιλλίνης.
- Επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

3.2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων DH5a library efficiency

Τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα DH5a library efficiency (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό με πλασμίδια που απομονώθηκαν από κύτταρα *S.pombe*. Η διαδικασία μετασχηματισμού γίνεται κάτω από στείρες συνθήκες και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού χρησιμοποιούνται 100μl δεκτικών βακτηρίων και 5μl πλασμιδίου.
- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Θερμικό πλήγμα για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C.
- Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 900μl SOC σε κάθε αντίδραση.
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.
- Επιστροφή όλων των κυττάρων σε τρυβλία LB-άγαρ παρουσία αμπικιλλίνης.
- Επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Minipreps)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας γίνεται με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- Εμβολιασμός μοναδιαίας αποικίας σε 3ml LB που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη) και επώαση στους 37°C για 16 ώρες υπό ανάδευση.
- Μεταφορά 1.5 ml καλλιέργειας σε σωληνάκι Eppendorf.
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για ένα λεπτό και απομάκρυνση υπερκείμενου.
- Λύση των κυττάρων με επαναδιάλυση του ιζήματος σε 300μl διαλύματος TENS.
- Εξουδετέρωση της αντίδρασης λύσης με προσθήκη 150μl διαλύματος NaAc 3N (pH 5,4).
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10 λεπτά και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι Eppendorf.
- Προσθήκη 900μl αιθανόλης 100% (-20°C).
- Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 2 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 900μl αιθανόλης 70% (-20°C).
- Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 2 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 20μl διαλύματος TE που περιέχει RNase σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml.

Πίνακας 3.13 Συστατικά διαλυμάτων για απομόνωση πλασμιδιακού DNA

	Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση
Διάλυμα TENS	Tris	10mM
	EDTA	1mM
	SDS	0.5%
	NaOH	0.1M
Διάλυμα NaAc	NaAc	3M
	Ρύθμιση pH με glacial acetic acid	
Διάλυμα Tris-EDTA, pH8	Tris	10 mM
	EDTA	1mM

3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midipreps)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας έγινε με το NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

3.2.8 Απομόνωση πλασμιδίων από κύτταρα *S. Pombe*

Για την απομόνωση πλασμιδίων από κύτταρα *S.pombe* χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Φυγοκέντρηση 1.5ml καλλιέργειας σε στατική φάση στις 3000 rpm για 3 λεπτά.
- Απομάκρυνση σχεδόν όλου του υπερκείμενου (αφήνουμε μία ποσότητα στην οποία επαναδιαλύεται το ίζημα).
- Προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης, 300μg γυάλινων σφαιριδίων και 200μl διαλύματος φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
- Έντονη ανάδευση με vortex για 2 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 λεπτά.
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι Eppendorf και εκ νέου προσθήκη 200μl διαλύματος φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη.
- Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 λεπτά.
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι Eppendorf.
- Προσθήκη 2-3 όγκων 100% αιθανόλη (σε θερμοκρασία -20°C) και 1/10 του όγκου 3M Sodium acetate pH5.5.
- Ανάδευση και επώαση στους -20°C για 16 ώρες.
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm στους 4°C για 15 λεπτά.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης (σε θερμοκρασία -20°C).
- Ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000rpm στους 4°C για 2 λεπτά.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξήρανση ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 10μl διαλύματος TE.

Πίνακας 3.14: Σύσταση διαλύματος λύσης

	Τελική συγκέντρωση
Triton X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100mM
Tris-HCl pH8.0	10mM
EDTA	1mM

Το DNA που απομονώνεται από την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό βακτηρίων DH5a library efficient της Invitrogen (5μl DNA ανά αντίδραση μετασχηματισμού).

3.2.9 Κατάτμηση τμημάτων DNA

Τα συστατικά των αντιδράσεων κατάτμησης των πλασμιδιακών φορέων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.15: Συστατικά αντίδρασης κατάτμησης

	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x)	1x
Περιοριστικό ένζυμο	1U/μg DNA
BSA	0.01%
DNA	1μg
ddH₂O	μέχρι τελικό όγκο 20μl

3.2.10 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα *S.pombe*

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Συλλογή κυττάρων από 10ml καλλιέργειας (σε στατική φάση) με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 3000rpm.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 0.5ml ddH₂O.

- Μεταφορά εναιωρήματος σε σωληνάκι Eppendorf 1.5ml, με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 3000rpm και απομάκρυνση υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 200μl διαλύματος λύσης.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και 300μl γυάλινα σφαιρίδια.
- Έντονη ανάδευση με vortex για 8 λεπτά.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος TE και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι Eppendorf και προσθήκη 1ml 100% αιθανόλη.
- Ανάδευση και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000rpm.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 400μl διαλύματος TE που περιέχει 30μg RNaseA.
- Επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.
- Προσθήκη 10μl ammonium acetate 4M και 1ml 100% αιθανόλης και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000rpm.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξήρανση ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 50μl διαλύματος TE.

Πίνακας 3.16 Σύσταση διαλύματος λύσης

	Τελική συγκέντρωση
Triton X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100mM
Tris-HCl pH8.0	10mM
EDTA	1mM

3.2.11 Real-time PCR

Στην παρούσα εργασία η σχετική ποσοτικοποίηση των αντιγράφων DNA δίπλα από την περιοχή των τελομερών έγινε με τη χρήση της ποσοτικής Real-time qPCR. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του μηχανήματος Step One, της

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta \text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta \text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Applied Biosystems και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος REST-MCS beta [167]. Η σχετική διαφοροποίηση του αριθμού αντιγράφων μίας περιοχής ενδιαφέροντος (ratio) υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη την απόδοση (efficiency) των εκκινητών για την περιοχή αυτή (E_{target}) και τη διαφορά στους κύκλους της PCR όπου ανιχνεύεται το προϊόν στο πειραματικό δείγμα και το δείγμα ελέγχου ($\Delta C_{\text{P}_{\text{target}}}(\text{control-sample})$), όπως επίσης και τις αντίστοιχες τιμές για μία περιοχή αναφοράς (E_{ref} , $\Delta C_{\text{P}_{\text{ref}}}(\text{control-sample})$). Η κανονικοποίηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται σύμφωνα με την εξής εξίσωση:

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για κάθε αντίδραση real-time qPCR:

Πίνακας 3.17: Συστατικά ανά αντίδραση real-time PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Kapa Master Mix (2x)	5μl
Fw εκκινητής (20μM)	0.15μl
Rv εκκινητής (20μM)	0.15μl
Γονιδιωματικό DNA	8ng
Water for Injection	Μέχρι τελικό όγκο 10μl

Πίνακας 3.18: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις real-time PCR

Εκκινητές	Αλληλουχία
ChrI left subtel Fw	5'- AAGGGGGAACGGAGAAACG -3'
ChrI left subtel Rv	5'- GTTGCCGACAACAGGGGTTA -3'
ChrI right subtel Fw	5'- CGAGATTCCTCGTAGCAGCA -3'
ChrI right subtel Rv	5'- AACACCGCGGCTTGATAGAT -3'
ChrII left subtel Fw	5'- GCCTGCGTAATATGTCGCTC -3'
ChrII left subtel Rv	5'- ACAGGTAGAAGTCGCTTGGC -3'
ChrII right subtel Fw	5'- GAGGGTTCGTGGGTCATCAG -3'
ChrII right subtel Rv	5'- CGCTGTCACCTTGTACACCTA -3'
ChrI 1.95Mb Fw	5'- AACTTGAACGTTGTCGCTGC -3'
ChrI 1.95Mb Rv	5'- CAATCCCTATGCTTTGGCG -3'
ChrI 3.9Mb Fw	5'- TCCTAGACCTGGCTCACCTC -3'
ChrI 3.9Mb Rv	5'- GAGCTTTCAGAGCGTTTGGC -3'

3.3 Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας

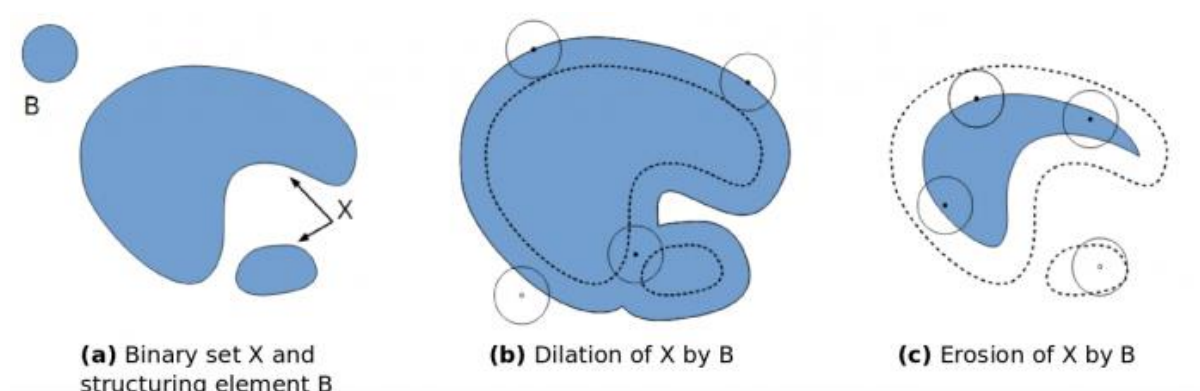
3.3.1 Μονιμοποίηση κυττάρων και χρώση πυρήνων με Hoechst

- Όγκος καλλιέργειας που περιέχει $\sim 10^7$ κύτταρα φυγοκεντρείται στις 2000rpm για 5 λεπτά.
- Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml ddH₂O και επαναιώρηση σε 0.5ml διαλύματος παραφολμαδεΐδης (PFA) 4%.
- Τα δείγματα επώάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν τρία πλυσίματα με 1ml ddH₂O για την απομάκρυνση της PFA και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml ddH₂O.
- Στο εναιώρημα προστίθεται η χρωστική Hoechst σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε σκοτεινό χώρο.
- Η περίσσεια χρωστικής απομακρύνεται με μία πλύση με ddH₂O και στη συνέχεια τα δείγματα στρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες.
-

3.3.2 Απεικόνιση κυττάρων και ανάλυση εικόνας

Η λήψη φωτογραφιών των κυττάρων *S.pombe* έγινε με τη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού ευρέως πεδίου Olympus IX83. Χρησιμοποιήθηκε x100 μεγέθυνση, ενώ έγινε λήψη stacks με βήμα 0.4 μm. Η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Αρχικά έγινε προ-επεξεργασία των εικόνων για την αφαίρεση θορύβου σήματος. Για το κανάλι της Hoechst χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος rolling ball. Κατά την εφαρμογή του rolling ball, για κάθε pixel της εικόνας δημιουργείται ένας μεγάλος κύκλος και η τιμή του θορύβου υπολογίζεται ως η μέση τιμή των pixel που περιέχονται σε αυτόν. Η ακτίνα του κύκλου πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το μέγεθος των αντικειμένων που δε θεωρούνται θόρυβος. Στην παρούσα ανάλυση, η ακτίνα που χρησιμοποιήθηκε για τον rolling ball αλγόριθμο ήταν 50 εικονοστοιχεία (pixel), μήκος το οποίο είναι αρκετά μεγαλύτερο από το μέγεθος των πυρήνων. Η αφαίρεση του θορύβου γίνεται με την αφαίρεση των τιμών που υπολογίστηκαν με τον rolling ball από τα pixel της αρχικής εικόνας. Για το κανάλι του GFP σήματος η αφαίρεση θορύβου έγινε με την εφαρμογή του αλγορίθμου top-hat. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την διαδοχική μορφολογική συστολή και διαστολή της εικόνας με το ίδιο δομικό στοιχείο. Κατά τη συστολή (erosion) πραγματοποιείται

αφαίρεση pixel στα σύνορα του αντικειμένου, με αποτέλεσμα τη διαγραφή ορισμένων στοιχείων (εικόνα 3.1 C). Αντίθετα, κατά τη διαστολή (dilation) γίνεται διεύρυνση των συνόρων των περιοχών των pixels που βρίσκονται στο προσκήνιο, με αποτέλεσμα το μεγάλωμα των αντικειμένων με την προσθήκη pixel στα σύνορα τους (εικόνα 3.1 B). Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε συγχώνευση δομών της εικόνας. Αυτός ο συνδυασμός πράξεων ονομάζεται μορφολογικό άνοιγμα. Ο αλγόριθμος top-hat υπολογίζει αρχικά το μορφολογικό άνοιγμα και στη συνέχεια αφαιρεί το αποτέλεσμα από την αρχική εικόνα. Η επεξεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση θορύβου λόγω μη ομοιόμορφης φωτεινότητας της εικόνας και συμβάλει στην καλύτερη διάκριση των αντικειμένων που μας ενδιαφέρουν (εστίες GFP).



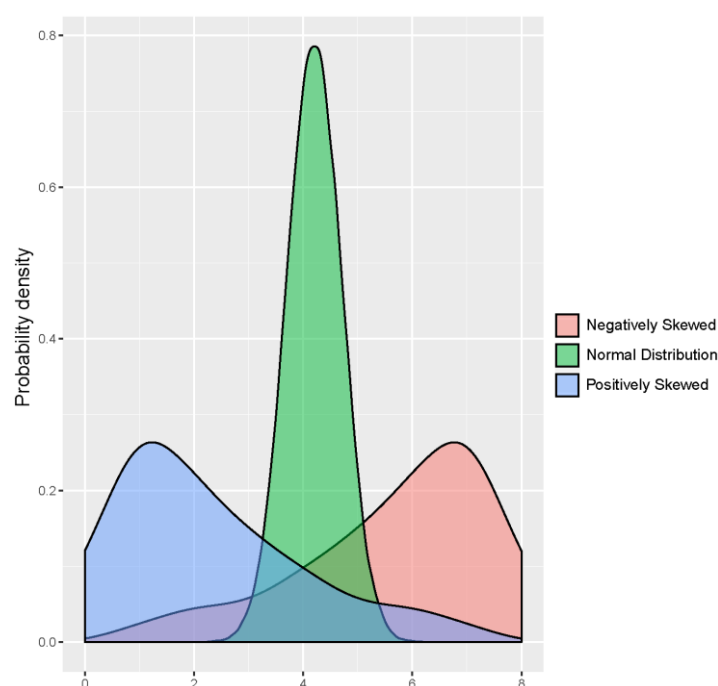
Εικόνα 3.1 Μορφολογική διαστολή και συστολή εικόνας με δομικό στοιχείο σχήματος κυκλικού δίσκου. Κατά τη διαστολή (B) γίνεται διεύρυνση των συνόρων των αντικειμένων με αποτέλεσμα τη συγχώνευση δομών. Κατά τη συστολή αφαιρούνται pixel από τα σύνορα των αντικειμένων η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαγραφή στοιχείων (πηγή: imagej.net/MorphoLibJ)

Μετά την αφαίρεση θορύβου του σήματος ακολούθησε ο διαχωρισμός των μεμονωμένων πυρήνων με τη βοήθεια του σήματος της Hoechst. Για την ποσοτικοποίηση του σήματος της Hoechst κάθε πυρήνα, χρησιμοποιήθηκε η ολοκληρωμένη πυκνότητα (integrated density) η οποία αντιπροσωπεύει το σύνολο των τιμών των pixel κάθε πυρήνα και ισούται με την επιφάνεια του πυρήνα επί τη μέση ένταση όλων των pixel της επιφάνειας. Στη συνέχεια σε κάθε πυρήνα αναγνωρίστηκαν οι εστίες GFP (foci) η ποσοτικοποίηση των οποίων έγινε και πάλι με τη χρήση του integrated density.

3.3.3 Μέτρα ετερογένειας κυτταρικών πληθυσμών

Ασυμμετρίας ή λοξότητα (Skewness)

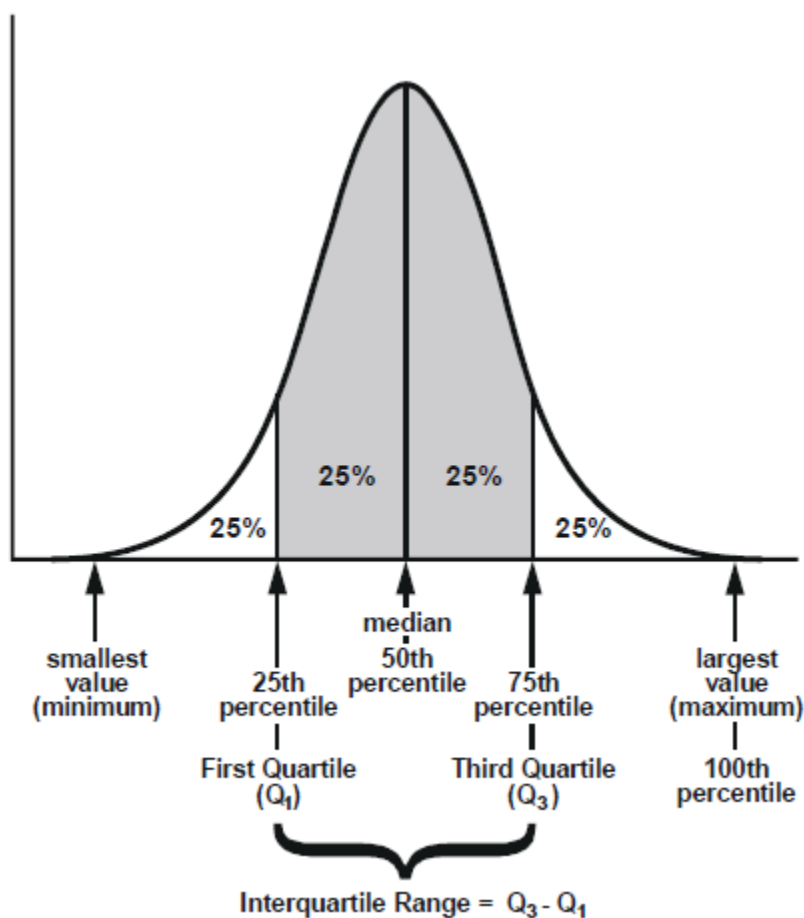
Η παράμετρος αυτή αποτελεί μέτρο συμμετρίας μιας κατανομής και περιγράφει τη απόκλισή της από την κανονική κατανομή. Στην περίπτωση της κανονικής κατανομής έχουμε μηδενική ασυμμετρία, η διάμεσος και η μέση τιμή ταυτίζονται και οι τιμές κατανέμονται συμμετρικά γύρω από αυτήν. Αν μία κατανομή έχει θετική ασυμμετρία τότε οι περισσότερες παρατηρήσεις καθώς και διάμεσος και μέση τιμή βρίσκονται δεξιά της κορυφής. Αντίθετα στην αρνητική ασυμμετρία οι περισσότερες παρατηρήσεις βρίσκονται αριστερά της κορυφής. Η εμφάνιση ασυμμετρίας και κατ' επέκταση η απόκλιση από την κανονικότητα αποτελεί ένδειξη αυξημένης ετερογένειας ενός πληθυσμού.



Εικόνα 3.2 Παραδείγματα συμμετρίας κατανομών. Στην κανονική κατανομή (πράσινο) οι τιμές κατανέμονται συμμετρικά γύρω από τη διάμεσο. Στις κατανομές με θετική ασυμμετρία (μπλε) η πλειοψηφία των παρατηρήσεων βρίσκεται δεξιά της κορυφής ενώ αντίθετα αριστερά της κορυφής στις κατανομές με αρνητική ασυμμετρία (κόκκινο).

Ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Interquartile range, IQR)

Μία κατανομή μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερα ίσα μέρη, τα τεταρτημόρια (Q1-Q4). Ως ενδοτεταρτημοριακό εύρος ορίζεται η διαφορά μεταξύ του 3^{ου} και 1^{ου} τεταρτημόριου. Έτσι λοιπόν το IQR εκφράζει το ενδιάμεσο 50% των παρατηρήσεων. Η αύξηση του ενδοτεταρτημοριακού υποδηλώνει αυξημένη ετερογένεια ενός πληθυσμού.



Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση του ενδοτεταρτημοριακού εύρους (IQR) μιας κατανομής.

Το IQR αποτελεί τη διαφορά μεταξύ τρίτου και πρώτου τεταρτημόριου και περιλαμβάνει το 50% των ενδιάμεσων τιμών μιας κατανομής. (Πηγή εικόνας: <http://my.ilstu.edu>)

Συντελεστής διακύμανσης ή μεταβλητότητας (Coefficient of variation, CV)

Ως διακύμανση σ^2 ορίζεται ο μέσος όρος των τετραγώνων των αποκλίσεων των μετρήσεων από τη μέση τιμή τους. Η διακύμανση αποτελεί μέτρο διασποράς και μετρά τη συγκέντρωση ή απομάκρυνση των τιμών γύρω από τη μέση τιμή. Η θετική τετραγωνική ρίζα της διακύμανσης μας δίνει την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η απευθείας σύγκριση των τυπικών αποκλίσεων διαφορετικών πληθυσμών μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα στην περίπτωση που οι μετρήσεις των πληθυσμών είτε εκφράζονται σε διαφορετικές μονάδες μέτρησης, είτε έχουν σημαντικές διαφορές στη μέση τιμή. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείτε ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of variation, CV), ο οποίος δίνεται από τον τύπο:

$$CV = \frac{\text{τυπική απόκλιση}}{\text{μέση τιμή}} \cdot 100\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%.$$

Ο συντελεστής διακύμανσης είναι ανεξάρτητος από τις μονάδες μέτρησης και αποτελεί μέτρο σχετικής διασποράς.

3.4 Αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την αλληλούχιση γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων αποτελείται από πολλαπλά βήματα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενζυμική λύση των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν προκειμένου να δημιουργηθούν σφαιροπλάστες, ενώ ακολούθησε ο διαχωρισμός μεμονωμένων σφαιροπλαστών σε σωληνάκια PCR. Έπειτα έγινε λύση των σφαιροπλαστών και ενίσχυση του γονιδιώματός τους. Το DNA που δημιουργήθηκε, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης του sequencing.

3.4.1 Διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων

Μετά τη δημιουργία σφαιροπλαστών ο διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων έγινε με τη βοήθεια του ειδικού κυτταροδιαχωριστή Beckman Coulter MoFlo high speed sorter.

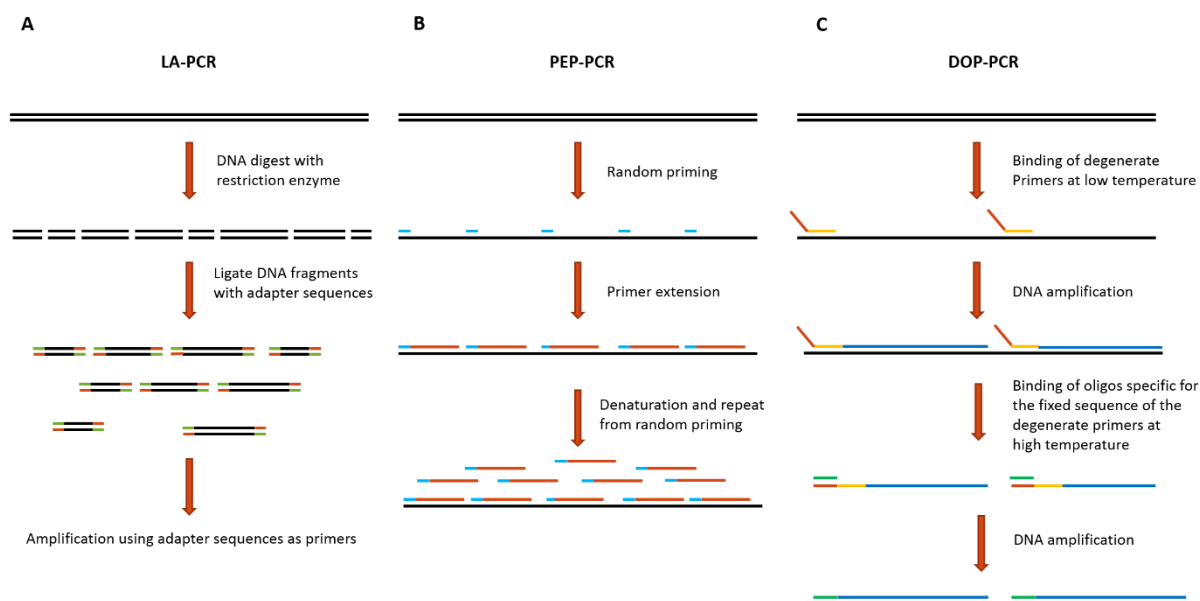
3.4.2 Ενίσχυση πλήρους γονιδιώματος (Whole Genome Amplification, WGA)

Η διαδικασία της αλληλούχισης πλήρους γονιδιώματος απαιτεί τουλάχιστον 50ng DNA ανά δείγμα, ενώ κατά μέσο όρο απλοειδή κύτταρα *S. rombe* στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου διαθέτουν 33.8fg DNA. Επομένως η ενίσχυση του γονιδιώματος είναι ένα απαραίτητο πρώτο βήμα για τη διαδικασία αυτή. Υπάρχουν τρεις βασικές προσεγγίσεις για την ενίσχυση γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων: α) μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) β) που πραγματοποιούν ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλών μεταθέσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA) και γ) η μέθοδος Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycle (MALBAC).

3.4.2.1 Μέθοδοι WGA που βασίζονται στην PCR

Οι μεθοδολογίες αυτές χωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες: α) την PCR με τη χρήση συνδετικού προσαρμογέα (linker adaptor PCR, LA-PCR) [168], β) τη μέθοδο προενίσχυσης με επέκταση εκκινητών (Primer extension pre-amplification, PEP-PCR) [169] και γ) την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση εκφυλισμένων εκκινητών (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR, DOP-PCR) [170]. Στην εικόνα 3.4 περιγράφονται τα βασικά βήματα των τριών μεθοδολογιών. Η μέθοδος LA-PCR περιλαμβάνει αρχικά την κατάτμηση του γονιδιώματος με ένα ένζυμο περιορισμού. Στη συνέχεια ακολουθούσε προσθήκη ειδικών αλληλουχιών με αντίδραση λιγάσης. Οι

αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια για την ομοιόμορφη ενίσχυση των τμημάτων DNA με PCR.

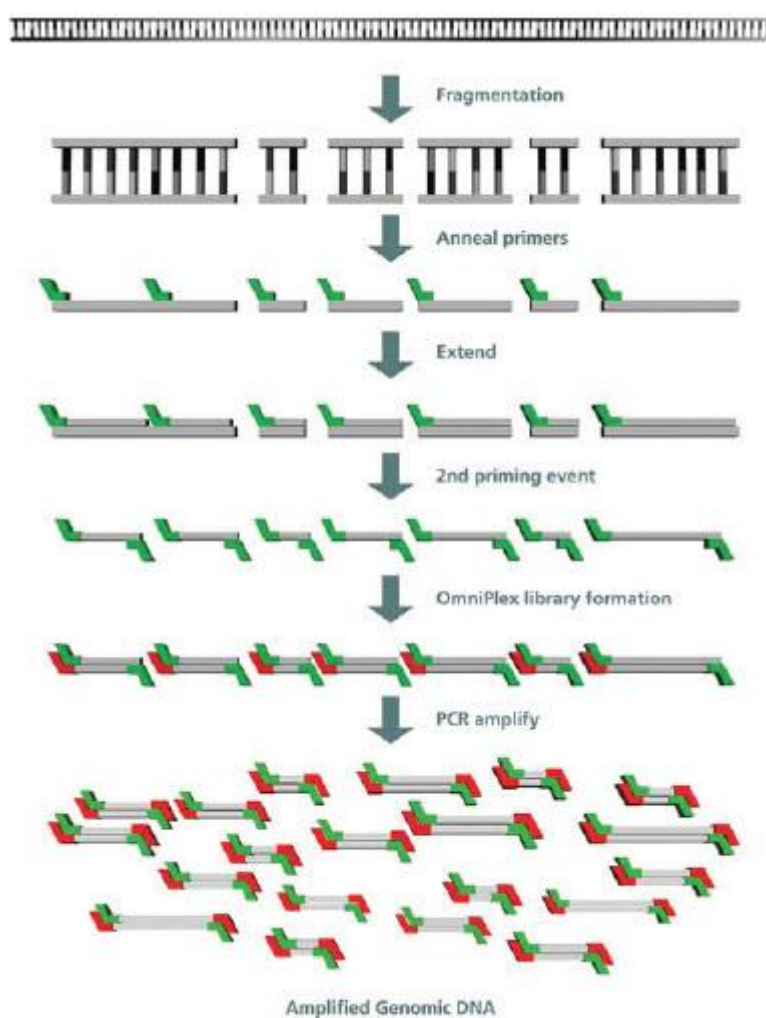


Εικόνα 3.4 Μέθοδοι ενίσχυσης γονιδιώματος (WGA) που βασίζονται στην PCR.

Κατά την PEP-PCR το DNA τεμαχίζεται σε τυχαία τμήματα και ακολουθεί ενίσχυση των τμημάτων με PCR με τη χρήση τυχαίων 6-νουκελοτιδίων εκκινητών και πολύ χαμηλής θερμοκρασίας υβριδοποίησης (annealing). Στην περίπτωση της DOP-PCR η ενίσχυση πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Αφού προηγηθεί θραυσματοποίηση του DNA σε τυχαία κομμάτια, ακολουθεί το πρώτο στάδιο ενίσχυσης με τη χρήση ειδικών εκφυλισμένων εκκινητών, οι οποίοι φέρουν τυχαίες αλληλουχίες στο 3' και μία σταθερή αλληλουχία στο 5' άκρο. Οι εκκινητές αυτοί έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να υβριδοποιούνται σχετικά ομοιόμορφα κατά μήκος του δείγματος DNA. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία ακολουθεί το δεύτερο στάδιο ενίσχυσης κατά το οποίο πραγματοποιείται PCR με ολιγονουκλεοτίδια που αναγνωρίζουν τη σταθερή αλληλουχία των εκφυλισμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα βήματα ενίσχυσης.

Ενίσχυση γονιδιώματος με τη μέθοδο GenomePlex

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το kit GenomePlex της εταιρίας Sigma-Aldrich για την ενίσχυση γονιδιώματος. Το συγκεκριμένο kit ανήκει στην κατηγορία των DOP-PCR τεχνικών και προσφέρει ενίσχυση του αρχικού δείγματος DNA ~500 φορές. Το αρχικό DNA των κυττάρων θραυσματοποιείται, ενώ στα άκρα των τμημάτων DNA που προκύπτουν, προστίθενται με PCR ειδικές αλληλουχίες. Το σύνολο των τμημάτων DNA με τις ειδικές αλληλουχίες στα άκρα ονομάζεται βιβλιοθήκη OmniPlex και αποτελεί το υπόστρωμα του δευτέρου βήματος ενίσχυσης με εκκινητές που αναγνωρίζουν τις ειδικές αλληλουχίες των άκρων (εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Διαδικασία ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος με τη χρήση του GenomePlex (Sigma-Aldrich)

Στον πίνακα 3.19 αναγράφονται όλα τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνει το κιτ. Η διαδικασία της ενίσχυσης χωρίζεται σε τρία βήματα α) τη θραυσματοποίηση του DNA, β) τη δημιουργία της βιβλιοθήκης OmniPlex και γ) η ενίσχυση. Αρχικά έγινε διαχωρισμός των μεμονωμένων κυττάρων με τη χρήση του sorter σε σωληνάκια PCR που περιείχαν 10μl H₂O που περιλάμβανε το κιτ. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο είχαν προστεθεί 100 κύτταρα κατά τη διαδικασία του sorting, ενώ ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε μία αντίδραση στην οποία δεν προστέθηκε κανένα κύτταρο. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

Θραυσματοποίηση DNA

- Προσθήκη 1μl Fragmentation Buffer 10× σε κάθε αντίδραση.
- Επώαση των δειγμάτων στους 95°C για ακριβώς 4 λεπτά.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο και σύντομη φυγοκέντρηση.

Δημιουργία βιβλιοθήκης OmniPlex

- Προσθήκη 2 μl Library Preparation Buffer 1× σε κάθε δείγμα.
- Προσθήκη 1μL Library Stabilization Solution.
- Σύντομη ανάδευση με vortex και σύντομη φυγοκέντρηση.
- Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή στους 95°C για 2 λεπτά.
- Σύντομη επώαση στον πάγο για να πέσει η θερμοκρασία των δειγμάτων, φυγοκέντρηση και επανατοποθέτηση στον πάγο.
- Προσθήκη 1 μL Library Preparation Enzyme, ανάδευση με vortex thoroughly, και σύντομη φυγοκέντρηση.
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή και επώαση με το παρακάτω πρόγραμμα:
 - 16 °C για 20 λεπτά
 - 24 °C για 20 λεπτά
 - 37 °C για 20 λεπτά
 - 75 °C για 5 λεπτά
 - 4 °C
- Σύντομη φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Στο στάδιο αυτό τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C για τρεις μέρες.

Ενίσχυση

- Προσθήκη 60μl Master Mix (πίνακας 3.20) σε κάθε δείγμα.
- Ανάδευση με vortex και σύντομη φυγοκέντρηση.

- Ενίσχυση βιβλιοθήκης σε θερμοκυκλοποιητή με το παρακάτω πρόγραμμα:
 - 94 °C για 3 λεπτά

Ακολουθούν 14 κύκλοι από:

- 94 °C για 15 δευτερόλεπτα
- 65 °C for 5 λεπτά

Μετά την ενίσχυση τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C.

Πίνακας 3.19: Αντιδραστήρια GenomePlex

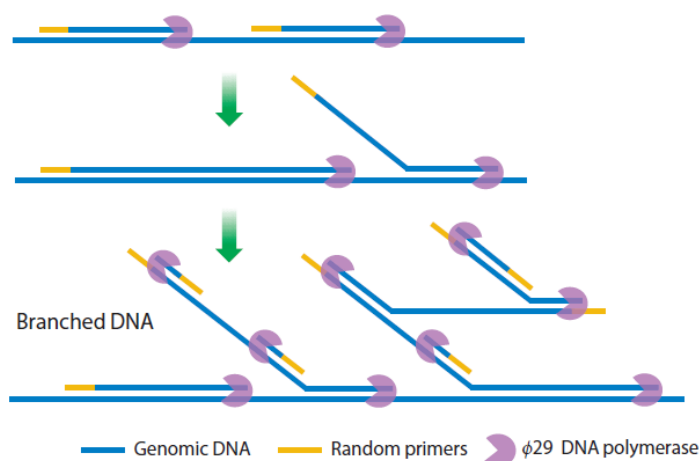
	Catalog Number
10× Fragmentation Buffer	F4304
1× Library Preparation Buffer	L7167
Library Stabilization Solution	L7292
Library Preparation Enzyme	E0531
10× Amplification Master Mix	A5604
WGA DNA Polymerase	W3891
Water, Molecular Biology Reagent	W4502

Πίνακας 3.20: Σύσταση Master Mix ενίσχυσης

	Ποσότητα ανά αντίδραση
Amplification Master Mix	7.5 µl
WGA DNA Polymerase	5 µl
H₂O	47.5µl

3.4.2.2 Μέθοδοι WGA που βασίζονται σε ισοθερμική ενίσχυση

Μία άλλη κατηγορία μεθόδων ενίσχυσης γονιδιώματος βασίζεται στην ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλών εκτοπίσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA) κατά την οποία γίνεται χρήση τυχαίων εκκινήτων και μιας ειδικής DNA πολυμεράσης (φ29 DNA polymerase) που προέρχεται από τον φάγο Φ29 του *Bacillus subtilis* [171]. Η πολυμεράση φ29 διαθέτει την ικανότητα εκτόπισης κλώνου κατά την αντιγραφή καθώς επίσης και εξαιρετικά υψηλή επεξεργασιμότητα δηλαδή ικανότητα συνέχισης της αντίδρασης πολυμερισμού χωρίς να αποσυνδέεται από το DNA. Η ενίσχυση του γονιδιώματος ξεκινάει με την αποδιάταξη του DNA και την υβριδοποίηση τυχαίων εκκινήτων (6μερών). Κατά τη σύνθεση του DNA, οι αλυσίδες που εκτοπίζονται, υβριδοποιούνται με νέους εκκινήτες (εικόνα 3.6). Έτσι λοιπόν διαδικασία ενίσχυσης περιλαμβάνει συνεχή αντικατάσταση των συντιθέμενων κλώνων από νέους με αποτέλεσμα τη δημιουργία διακλαδισμένων δομών DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία 30°C, καθώς η ικανότητα μετατόπισης κλώνου της φ29 δεν απαιτεί επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης του DNA. Η ισχυρή επεξεργασιμότητα του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μεγάλων τμημάτων DNA που φτάνουν μέχρι τα 100kb καθώς και τη δυνατότητα επίλυσης δευτεροταγών δομών του DNA. Επιπλέον, η φ29 πολυμεράση διαθέτει ενεργότητα εξωνουκλεάσης διορθωτικού ελέγχου 3'-5', ελαχιστοποιώντας τη λάθος ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σε σχέση με την Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται στις μεθόδους WGA που βασίζονται στην PCR.



Εικόνα 3.6 WGA με ενίσχυση πολλαπλών εκτοπίσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA). Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση τυχαίων εκκινήτων (κίτρινο) και της φ29 DNA πολυμεράσης (μωβ) που διαθέτει ικανότητα εκτόπισης κλώνου [172].

Ενίσχυση γονιδιώματος με τη μέθοδο REPLI-g

Το REPLI-g Single Cell Kit της εταιρίας Qiagen ανήκει στην κατηγορία των MDA τεχνικών και χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ενίσχυση γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων. Στον πίνακα 3.21 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια του kit. Αρχικά έγινε ο διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων σε χρήση sorter σε σωληνάκια PCR που περιείχαν 4μl PBS sc. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο είχαν προστεθεί 100 κύτταρα κατά τη διαδικασία του sorting, ενώ ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε μία αντίδραση στην οποία δεν προστέθηκε κανένα κύτταρο. Στη συνέχεια για την ενίσχυση ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη 3μl Buffer D2 (πίνακας 3.22) και προσεκτική ανάμειξη αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι.
- Σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση για 10 λεπτά στους 65°C για την αποδιάταξη του DNA.
- Προσθήκη 3μl Stop Solution, προσεκτική ανάμειξη και σύντομη φυγοκέντρηση.
- Προετοιμασία master mix σύμφωνα με τον πίνακα 3.23.
- Προσθήκη 40μl master mix σε κάθε δείγμα και επώαση στους 30°C για 8 ώρες.
- Απενεργοποίηση της πολυμεράσης με επώαση στους 65°C για 3 λεπτά.
- Στο στάδιο αυτό, τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.

Πίνακας 3.21: Αντιδραστήρια REPLI-g Single Cell Kit

	Ποσότητα (24 αντιδράσεις)
REPLI-g sc DNA Polymerase	48μl
REPLI-g sc Reaction Buffer	700μl
Buffer DLB	1 tube
Stop Solution	1.8ml
PBS sc 1x	1.5ml
DTT 1M	1ml
H₂O	1.5ml

Πίνακας 3.22: Σύσταση Buffer D2

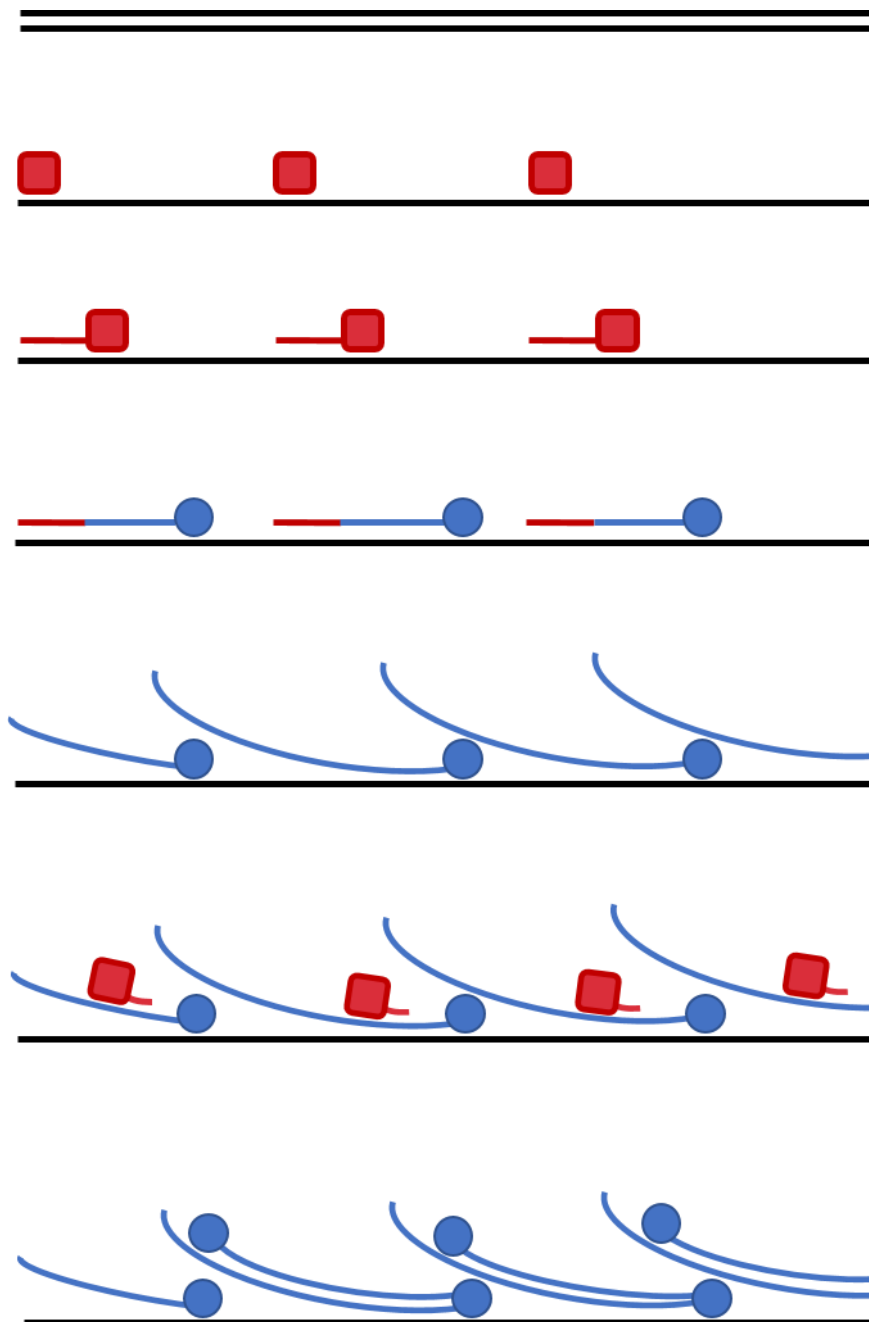
	Όγκος για 12 αντιδράσεις
DDT (1M)	3μl
Buffer DLB	33μl

Πίνακας 3.23: Σύσταση Master mix

	Όγκος/αντίδραση
H₂O sc	9μl
REPLI-g sc Reaction Buffer	29μl
REPLI-g sc DNA Polymerase	2μl

Ενίσχυση γονιδιώματος με τη μέθοδο TruePrime

Το TruePrime Single Cell WGA kit της εταιρίας SYGNIS αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου MDA. Βασίζεται και πάλι στην ισοθερμικής ενίσχυση του DNA από την φ29 DNA πολυμεράση, χωρίς όμως τυχαίους εκκινητές. Αντιθέτως χρησιμοποιεί την πριμάση TthPrimPol για την σύνθεση εκκινητών.



Εικόνα 3.7 Διαδικασία ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος με τη χρήση του TruePrime (SYGNIS).

Η μέθοδος βασίζεται στη σύνθεση εκκινητών με τη χρήση της πριμάσης TthPrimPol (κόκκινο) και την ισοθερμική ενίσχυση του γονιδιώματος από τη φ29 DNA πολυμεράση (μπλε)

Στον πίνακα 3.24 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια του kit. Αρχικά έγινε ο διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων σε χρήση sorter σε σωληνάκια PCR που περιείχαν 2.5μl PBS. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο είχαν προστεθεί 100 κύτταρα κατά τη διαδικασία του sorting, ενώ ως αρνητικό δείγμα

χρησιμοποιήθηκε μία αντίδραση στην οποία δεν προστέθηκε κανένα κύτταρο. Στη συνέχεια για την ενίσχυση ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη 2.5μl Lysis Buffer L2 (πίνακας 3.25) σε κάθε δείγμα και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.
- Εξουδετέρωση της λύσης με προσθήκη 2.5 Buffer N.
- Προσθήκη 42.5μl amplification mix (πίνακας 3.26).
- Επώαση δειγμάτων για 3 ώρες στους 30°C.
- Τερματισμός της αντίδρασης ενίσχυσης και απενεργοποίηση της πολυμεράσης με επώαση για 10 λεπτά στους 65°C.

Μετά την ενίσχυση τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C.

Πίνακας 3.24: Αντιδραστήρια TruePrime Single Cell WGA kit

	Ποσότητα (24 αντιδράσεις)
Buffer L1 (Lysis)	70 μl
DTT	50 μl
Buffer N (Neutralization)	70 μl
Reaction Buffer	140 μl
dNTPs	140 μl
H₂O	750 μl
Enzyme 1 (TthPrimPol)	140 μl
Enzyme 2 (Phi29 DNA Pol)	20 μl

Πίνακας 3.25: Σύσταση Lysis Buffer L2

	Όγκος για 10 αντιδράσεις
DTT	2.5 μl
Buffer L1	22.5 μl

Πίνακας 3.26: Σύσταση amplification mix

	Όγκος/αντίδραση
H₂O	26.8 μl
Reaction Buffer	5 μl
dNTPs	5 μl
Enzyme 1	5 μl
Enzyme 2	0.7 μl

3.5 Ανάλυση καρκινικών δεδομένων της TCGA

3.5.1 Λήψη δεδομένων

Για τη διερεύνηση του ρόλου των CDT1 και CDC6 στην ενίσχυση γενετικών τόπων σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα του Cancer Genome Atlas (TCGA) project. Πρόκειται για ένα πρότζεκτ που ξεκίνησε το 2005 και στόχος του ήταν η καταγραφή μεταλλάξεων που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου. Είναι μία συνεργασία μεταξύ του National Cancer Institute (NCI) και National Human Genome Research Institute (NHGRI). Τα δεδομένα του TCGA αφορούν 33 τύπους καρκίνου από πάνω από 11.000 ασθενείς. Τα δεδομένα της TCGA προέρχονται από καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα ασθενών και περιλαμβάνουν κλινικές πληροφορίες, μεταδεδομένα (πχ πρωτόκολλα), εικόνες ιστοπαθολογίας και μοριακά δεδομένα όπως επίπεδα έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών.

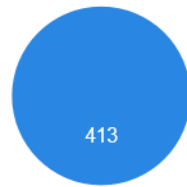
Η ανάκτηση των δεδομένων έγινε σε γλώσσα προγραμματισμού R με τη χρήση του πακέτου cgdscr. Για κάθε τύπο καρκίνου χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα για τα οποία υπήρχαν πληροφορίες και για την έκφραση (σε επίπεδο mRNA) αλλά και για τον αριθμό αντιγράφων όλων των γονιδίων (mRNA & CNA data). Για κάθε ένα από τα σετ δεδομένων του TCGA χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα «mRNA expression (RNA Seq V2 RSEM)» για τον προσδιορισμό της έκφρασης κάθε γονιδίου και τα δεδομένα «Putative copy-number alterations from GISTIC» για τον προσδιορισμό της ενίσχυσης ή απαλοιφής των αντίστοιχων γενετικών τόπων.

Τα σετ δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή φαίνονται στον πίνακα 3.27, ενώ στην εικόνα 3.8 αναφέρονται αναλυτικά οι διαφορετικοί υπότυποι καρκίνου που περιλαμβάνονται σε κάθε σετ.

Πίνακας 3.27: ΣΕΤ δεδομένων διαφορετικών τύπων καρκίνου.

Cancer Study ID	Τύπος καρκίνου
blca_tcga	Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, Provisional)
brca_tcga	Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Provisional)
cesc_tcga	Cervical Squamous Cell Carcinoma (TCGA, Provisional)
hnsc_tcga	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (TCGA, Provisional)
lihc_tcga	Liver Hepatocellular Carcinoma (TCGA, Provisional)
luad_tcga	Lung Adenocarcinoma (TCGA, Provisional)
lusc_tcga	Lung Squamous Cell Carcinoma (TCGA, Provisional)
stad_tcga	Stomach Adenocarcinoma (TCGA, Provisional)

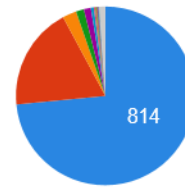
**Bladder Urothelial Carcinoma
(n=413)**



Cancer Type Detailed

- Bladder Urothelial Carcinoma: 413 (100.0%)

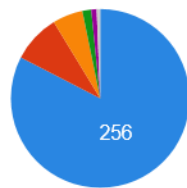
**Breast Invasive Carcinoma
(n=1105)**



Cancer Type Detailed

- Breast Invasive Ductal Carcinoma: 814 (73.5%)
- Breast Invasive Lobular Carcinoma: 207 (18.7%)
- Breast Mixed Ductal and Lobular Carcinoma: 28 (2.5%)
- Breast Invasive Mixed Mucinous Carcinoma: 16 (1.4%)
- Metaplastic Breast Cancer: 14 (1.3%)
- Invasive Breast Carcinoma: 6 (0.5%)
- Paget Disease of the Nipple: 3 (0.3%)
- Adenoid Cystic Breast Cancer: 2 (0.2%)
- Malignant Phyllodes Tumor of the Breast: 2 (0.2%)
- Solid Papillary Carcinoma of the Breast: 2 (0.2%)
- Basal Cell Carcinoma: 1 (<0.1%)
- Breast Invasive Carcinoma, NOS: 1 (<0.1%)
- NA: 12 (1.1%)

**Cervical Squamous Cell Carcinoma
(n=310)**



Cancer Type Detailed

- Cervical Squamous Cell Carcinoma: 256 (82.6%)
- Endocervical Adenocarcinoma: 27 (8.7%)
- Mucinous Carcinoma: 17 (5.5%)
- Cervical Adenosquamous Carcinoma: 5 (1.6%)
- Cervical Endometrioid Carcinoma: 3 (1.0%)
- NA: 2 (0.6%)

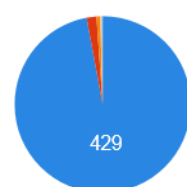
**Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
(n=530)**



Cancer Type Detailed

- Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: 530 (100.0%)

**Liver Hepatocellular Carcinoma
(n=442)**



Cancer Type Detailed

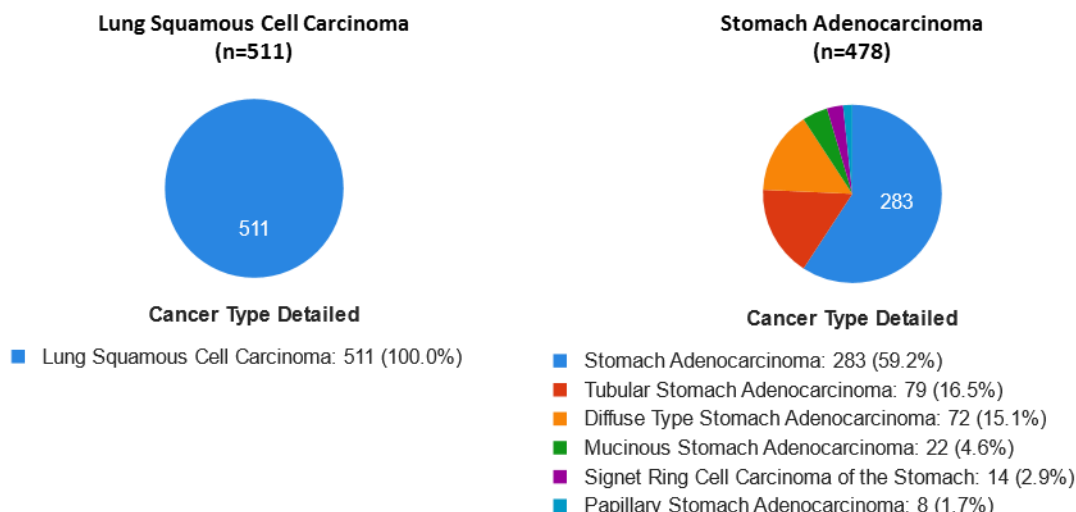
- Hepatocellular Carcinoma: 429 (97.1%)
- Hepatocellular Carcinoma plus Intrahepatic Cholangiocarcinoma: 8 (1.8%)
- Fibrolamellar Carcinoma: 3 (0.7%)
- NA: 2 (0.5%)

**Lung adenocarcinoma
(n=586)**



Cancer Type Detailed

- Lung Adenocarcinoma: 586 (100.0%)



Εικόνα 3.8 Σχηματική αναπαράσταση των δεδομένων της TCGA για τους διαφορετικούς τύπους που αναλύθηκαν. Σε κάθε τύπο καρκίνου αναφέρονται οι διαφορετικές υποκατηγορίες που περιλαμβάνει το σετ δεδομένων (πηγή εικόνας <http://www.cbioportal.org/>).

Δεδομένα έκφρασης «RNA Seq V2 RSEM»

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήσαμε δεδομένα από αλληλούχιση mRNA τα οποία έχουν κανονικοποιηθεί με τη μέθοδο RSEM [173]. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί δεδομένα που έχουν προκύψει από αλληλούχιση mRNA (single-end ή paired-end) για την ποσοτικοποίηση της σχετικής αφθονίας μεταγράφων. Αρχικά πραγματοποιείται στοίχιση των reads που προκύπτουν από το sequencing σε ένα reference genome ή αν υπάρχει διαθέσιμο στο αντίστοιχο reference transcriptome με τη χρήση του αλγόριθμου Bowtie [174]. Στη συνέχεια η μέθοδος RSEM υπολογίζει την αφθονία κάθε μετάγραφου με βάση τον αλγόριθμο Expectation-Maximization (EM). Η αφθονία των μεταγράφων αποτελεί το κλάσμα του αριθμού ενός συγκεκριμένου μετάγραφου ως προς το συνολικό αριθμό μεταγράφων και εκφράζεται σε transcripts per million (TPM). Η μετρική αυτή προτιμάται έναντι των RPKM (Reads Per Kilobase Million) [175] και FPKM (Fragments Per Kilobase Million) [176] καθώς είναι ανεξάρτητη του μεγέθους των μεταγράφων.

Δεδομένα CNA «Putative copy-number alterations from GISTIC»

Για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα της TCGA τα οποία προκύπτουν από πειράματα μικροσυστοιχιών με χρήση της πλατφόρμας Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0. Η εύρεση περιοχών που φέρουν αλλαγές ως προς τον αριθμό αντιγράφων τους σε σχέση με τη φυσιολογική διπλοειδή κατάσταση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση με τον αλγόριθμο GISTIC. Ο αλγόριθμος GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) αναγνωρίζει τμήματα του γονιδιώματος, ενός συνόλου δειγμάτων, τα οποία είτε εμφανίζονται σημαντικά ενισχυμένα είτε έχουν υποστεί απαιόφι. Κάθε απόκλιση από την διπλοειδή κατάσταση περιγράφεται με ένα G-score (GISTIC score) το οποίο λαμβάνει υπόψη τόσο το μέγεθος της απόκλισης όσο και τη συχνότητα εμφάνισής του στο σύνολο των δειγμάτων [177]. Το GISTIC score παίρνει διακριτές τιμές (-2 έως 2) και διαχωρίζει τα δείγματα σε 5 κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του εκάστοτε γονιδίου. Στον πίνακα 3.28 παρουσιάζεται η αντιστοίχιση των τιμών με τον αριθμό αντιγράφων.

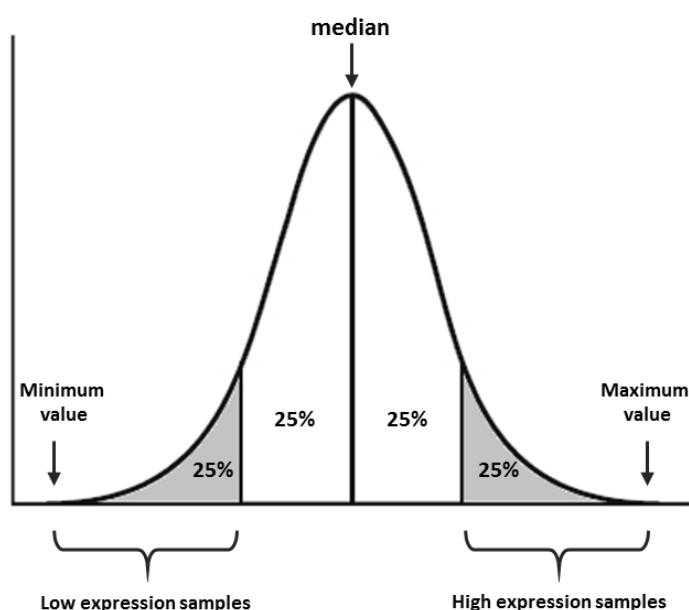
Για κάθε περιοχή που παρουσιάζει απόκλιση υπολογίζεται το q-value που εκφράζει το ποσοστό εσφαλμένων ανακαλύψεων (False Discovery Rate, FDR), προκειμένου να αναγνωριστούν μόνο οι περιοχές που εμφανίζουν σημαντική απόκλιση, ενώ επιπλέον αναγνωρίζονται όλα τα γονίδια τα οποία εμπίπτουν στην περιοχή.

Πίνακας 3.28: Αντιστοίχιση GISTIC score με αριθμό αντιγράφων των γονιδίων.

GISTIC score	Κατάσταση αριθμού αντιγράφων
-2	Απουσία και των δύο αλληλομόρφων (Deep Deletion)
-1	Απουσία του ενός αλληλόμορφου (Shallow Deletion)
0	Διπλοειδή (φυσιολογική κατάσταση) (Diploid)
1	Ενίσχυση γονιδίου (Copy Gain)
2	Εκτεταμένη γονιδιακή ενίσχυση (Amplification)

3.5.2 Κατηγοριοποίηση δειγμάτων με βάση την έκφραση πρωτεϊνών και επιπέδων γονιδιακής ενίσχυσης.

Για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση την έκφραση ενός γονιδίου (πχ. CDT1) κατασκευάστηκε η κατανομή της έκφρασης του γονιδίου αυτού και στη συνέχεια διαχωρίστηκε σε τέσσερα (ή δύο κατά περίπτωση) ίσα μέρη. Τα δείγματα που ανήκουν στο μέρος της κατανομής με τις υψηλότερες και χαμηλότερες εκφράσεις χαρακτηρίστηκαν ως high και low αντίστοιχα.



Εικόνα 3.9 Παράδειγμα ομαδοποίησης ασθενών με βάση την έκφραση ενός γονιδίου. Ως δείγματα με χαμηλή έκφραση (*low*) χαρακτηρίστηκαν εκείνα που ανήκουν στο 25% των χαμηλότερων τιμών. Τα δείγματα που ανήκουν στο 25% των υψηλότερων τιμών αποτέλεσαν τα δείγματα υψηλής έκφρασης (*high*).

Για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση τον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα Putative copy number alterations. Στο συγκεκριμένο σετ δεδομένων για κάθε γονίδιο δίνεται μία τιμή που ονομάζεται GISTIC score και χωρίζει τα δείγματα σε 5 κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του εκάστοτε γονιδίου. Το GISTIC score παίρνει διακριτές τιμές (-2 έως 2) και η αντιστοίχιση των τιμών με τον αριθμό αντιγράφων φαίνεται στον πίνακα 3.28.

3.5.3 Υπολογισμός δείκτη συνολικής γονιδιακής ενίσχυσης (total amplification score)

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο συνολικός βαθμός γονιδιακής ενίσχυσης κάθε δείγματος, δημιουργήθηκε και υπολογίστηκε το total amplification score. Για κάθε διαφορετικό τύπο καρκίνου αρχικά βρεθηκαν τα γονίδια που εμφανίζουν γονιδιακή ενίσχυση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% των δειγμάτων. Επειδή πολλά από αυτά τα γονίδια ήταν μέρος μιας ευρύτερης ενισχυμένης περιοχής επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό γονίδιο ανα περιοχή. Στη συνέχεια ως total amplification score του κάθε δείγματος, ορίστηκε το άθροισμα των GISTIC scores των επιλεγμένων γονιδίων. Στους πίνακες 3.29 έως 3.36 αναγράφονται τα γονίδια που συμπεριλήφθηκαν στον υπολογισμό του total amplification score για κάθε σετ καρκινικών δεδομένων, καθώς επίσης η θέση τους στο γονιδίωμα (Cytoband), το είδος της αλλαγής ως προς τον αριθμό αντιγράφων (CNA) όπου μπορεί να είναι είτε ενίσχυση (Amp) είτε απαλοιφή (Del) και τέλος το ποσοστό των δειγμάτων που φέρουν την αλλαγή αυτή.

Πίνακας 3.29: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα (Bladder Urothelial Carcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
CCND1	11q13.3	AMP	11.52%
NOTCH2	1p12	AMP	10.05%
MCL1	1q21.2	AMP	11.76%
ARNT	1q21.3	AMP	11.27%
NCSTN	1q23.2	AMP	12.25%
B4GALT3	1q23.3	AMP	16.91%
PPARG	3p25.2	AMP	14.22%
SDHA	5p15.33	AMP	10.29%
E2F3	6p22.3	AMP	16.18%
ADGRA2	8p11.23	AMP	10.29%
COX6C	8q22.2	AMP	14.71%

Πίνακας 3.30: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Breast Invasive Carcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
CCND1	11q13.3	AMP	16.39%
ERBB2	17q12	AMP	12.31%
IKZF3	17q12- q21.1	AMP	11.76%
PPM1D	17q23.2	AMP	11.02%
NOTCH2	1p12	AMP	13.15%
PDE4DIP	1q21.2	AMP	12.50%
ARNT	1q21.3	AMP	13.33%
MUC1	1q22	AMP	12.04%
PRCC	1q23.1	AMP	10.83%
NCSTN	1q23.2	AMP	11.94%
NUF2	1q23.3	AMP	11.39%
PRRX1	1q24.2	AMP	10.09%
TPR	1q31.1	AMP	10%
CDC73	1q31.2	AMP	10.19%
MDM4	1q32.1	AMP	13.06%
TRAF5	1q32.3	AMP	11.39%
H3F3A	1q42.12	AMP	12.78%
OBSCN	1q42.13	AMP	12.78%
FH	1q43	AMP	13.24%
NLRP3	1q44	AMP	13.80%
ZNF703	8p11.23	AMP	13.43%
PAG1	8q21.13	AMP	10.83%
RUNX1T1	8q21.3	AMP	14.44%
COX6C	8q22.2	AMP	16.02%
RSP02	8q23.1	AMP	16.20%
RAD21	8q24.11	AMP	18.89%
MYC	8q24.21	AMP	21.20%
NDRG1	8q24.22	AMP	16.39%
RECQL4	8q24.3	AMP	14.35%

Πίνακας 3.31: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας (Cervical Squamous Cell Carcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
YAP1	11q22.1	AMP	10.85%
PIK3CB	3q22.3	AMP	10.17%
ATR	3q23	AMP	10.85%
AADACL2	3q25.1	AMP	13.22%
TIPARP	3q25.31	AMP	14.92%
MLF1	3q25.32	AMP	14.92%
MECOM	3q26.2	AMP	21.02%
PIK3CA	3q26.32	AMP	20.34%
SOX2	3q26.33	AMP	19.32%
KLHL6	3q27.1	AMP	18.98%
ETV5	3q27.2	AMP	18.98%
EIF4A2	3q27.3	AMP	18.98%
TP63	3q28	AMP	21.02%
FGF12	3q28-q29	AMP	19.32%
TFRC	3q29	AMP	20%

Πίνακας 3.32: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
FGF3	11q13.3	AMP	24.71%
ATR	3q23	AMP	11.88%
AADACL2	3q25.1	AMP	14.56%
GMPS	3q25.31	AMP	14.56%
MLF1	3q25.32	AMP	14.56%
MECOM	3q26.2	AMP	19.16%
PIK3CA	3q26.32	AMP	20.88%
SOX2	3q26.33	AMP	20.88%
KLHL6	3q27.1	AMP	20.69%
MAP3K13	3q27.2	AMP	20.11%
BCL6	3q27.3	AMP	19.92%
LPP	3q27.3-q28	AMP	20.50%
TP63	3q28	AMP	21.84%
FGF12	3q28-q29	AMP	18.77%
TFRC	3q29	AMP	18.97%

EGFR	7p11.2	AMP	10.73%
MYC	8q24.21	AMP	11.88%
AGO2	8q24.3	AMP	10.73%

Πίνακας 3.33: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Liver Hepatocellular Carcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
NOTCH2	1p12	AMP	10.27%
MCL1	1q21.2	AMP	12.43%
CKS1B	1q21.3	AMP	13.78%
MUC1	1q22	AMP	14.05%
PRCC	1q23.1	AMP	12.43%
NCSTN	1q23.2	AMP	11.62%
SDHC	1q23.3	AMP	12.43%
COP1	1q25.1- q25.2	AMP	10%
CDC73	1q31.2	AMP	10%
ELF3	1q32.1	AMP	10.54%
PRDM14	8q13.3	AMP	11.35%
ELOC	8q21.11	AMP	11.35%
PAG1	8q21.13	AMP	13.51%
NBN	8q21.3	AMP	13.24%
COX6C	8q22.2	AMP	15.41%
RSP02	8q23.1	AMP	15.95%
RAD21	8q24.11	AMP	17.84%
MYC	8q24.21	AMP	17.57%
NDRG1	8q24.22	AMP	17.03%
RECQL4	8q24.3	AMP	15.95%

Πίνακας 3.34: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα (Lung Adenocarcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
NFKB1A	14q13.2	AMP	12.60%
FOXA1	14q21.1	AMP	11.82%
NOTCH2	1p12	AMP	12.21%
APH1A	1q21.2	AMP	14.34%
ARNT	1q21.3	AMP	14.34%

MUC1	1q22	AMP	12.40%
NCSTN	1q23.2	AMP	10.47%
FCGR2B	1q23.3	AMP	10.47%
RICTOR	5p13.1	AMP	10.27%
SKP2	5p13.2	AMP	11.24%
DROSHA	5p13.3	AMP	10.47%
ICE1	5p15.32	AMP	13.95%
TERT	5p15.33	AMP	17.05%
MYC	8q24.21	AMP	10.47%

Πίνακας 3.35: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (Lung Squamous Cell Carcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
CCND1	11q13.3	AMP	13.97%
EPHA6	3q11.2	AMP	10.78%
FOXL2	3q22.3	AMP	16.37%
ATR	3q23	AMP	19.76%
AADACL2	3q25.1	AMP	28.14%
CCNL1	3q25.31	AMP	28.94%
MLF1	3q25.32	AMP	30.54%
MECOM	3q26.2	AMP	43.71%
PIK3CA	3q26.32	AMP	46.51%
SOX2	3q26.33	AMP	48.30%
KLHL6	3q27.1	AMP	46.91%
MAP3K13	3q27.2	AMP	43.71%
EIF4A2	3q27.3	AMP	40.32%
LPP	3q27.3-q28	AMP	40.12%
TP63	3q28	AMP	41.12%
FGF12	3q28-q29	AMP	38.92%
RPL35A	3q29	AMP	39.12%
FGF10	5p12	AMP	14.77%
LIFR	5p13.1	AMP	15.97%
SKP2	5p13.2	AMP	15.17%
DROSHA	5p13.3	AMP	15.17%
ICE1	5p15.32	AMP	16.97%
SDHA	5p15.33	AMP	19.96%
FGFR1	8p11.23	AMP	18.36%

MYC	8q24.21	AMP	10.38%
------------	---------	-----	--------

Πίνακας 3.36: Ενισχυμένα γονίδια σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα στομάχου (Stomach Adenocarcinoma)

GENE	CYTOBAND	CNA	FREQ
ERBB2	17q12	AMP	14%
IKZF3	17q12- q21.1	AMP	13%
CCNE1	19q12	AMP	12%
ZNF217	20q13.2	AMP	11%
MYC	8q24.21	AMP	13%

4. Αποτελέσματα

4.1 Μελέτη του φαινομένου της επαναντιγραφής του DNA στον σχιζοσακχαρομύκητα *S.pombe*

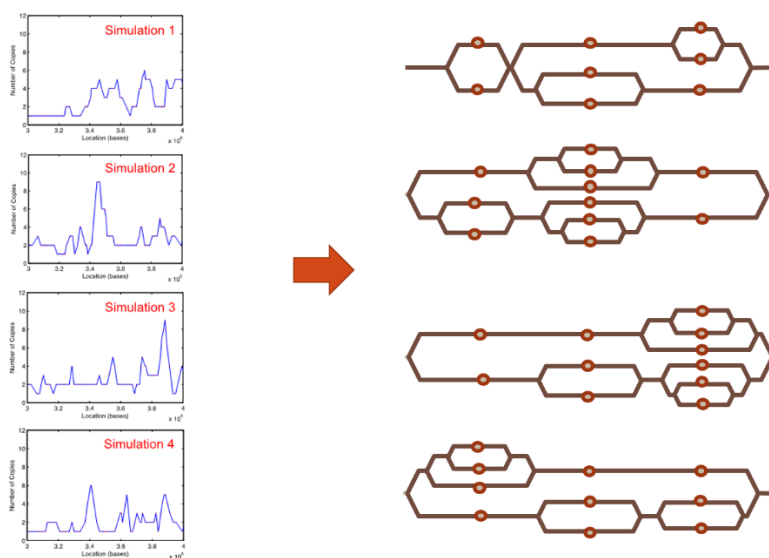
4.1.1 Μελέτη της επαναντιγραφής συγκεκριμένων περιοχών σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου προχώρησαν στη δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου το οποίο προσομοιάζει τη διαδικασία της επαναντιγραφής στον *S.pombe* (Διδακτορική διατριβή Μαριάννας Ραφομανίκη). Αποτελεί επέκταση του μοντέλου της αντιγραφής του DNA στον *S.pombe* [178], ενώ επιπλέον επιτρέπει την επαναπυροδότηση των αφετηριών. Πρόκειται για ένα στοχαστικό υβριδικό μοντέλο το οποίο περιλαμβάνει διακριτές μεταβλητές όπως η κατάσταση των αφετηριών και συνεχείς μεταβλητές όπως η κίνηση των κινούμενων αντιγραφικών διχαλών. Αρχικά οι αφετηρίες βρίσκονται στην προαντιγραφική κατάσταση (Pre-R). Η πυροδότηση αυτών οδηγεί στη δημιουργία μίας αντιγραφικής διχάλας που κινείται και προς τις δύο κατευθύνσεις (RB) μέχρι να συναντήσει μία γειτονική διχάλα και να συμβεί συγχώνευση με αποτέλεσμα την κίνηση της αντιγραφής είτε μόνο προς την αριστερή (RL) είτε προς τη δεξιά (RR) κατεύθυνση. Σε περίπτωση που δε συμβεί πυροδότηση της αφετηρίας αυτή αντιγράφεται παθητικά (Pass-R) από διερχόμενη αντιγραφική διχάλα γειτονικής αφετηρίας. Τέλος η αντιγραφή ολοκληρώνεται με τη συγχώνευση των αντιγραφικών διχαλών και προς τις δύο κατευθύνσεις (Post-R).

Ως δεδομένα εισόδου το μοντέλο χρησιμοποιεί το συνολικό μήκος του γονιδιώματος, την τοποθεσία των αφετηριών και την αποδοτικότητα πυροδότησής τους καθώς και την ταχύτητα των αντιγραφικών διχαλών. Για τον *S.pombe* τα δεδομένα αυτά έχουν προσδιοριστεί πειραματικά στη μελέτη [35] όπου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αναστολή της αντιγραφής του DNA στα αρχικά στάδια της S φάσης με τη χρήση υδροξυουρίας (HU) και στη συνέχεια με τη χρήση της τεχνικών συγκριτικής υβριδοποίησης γονιδιώματος (Comparative Genomic Hybridization, CGH) προσδιορίστηκαν οι θέσεις των αφετηριών της αντιγραφής καθώς επίσης και η αποδοτικότητά τους, η οποία αποτελεί το ποσοστό των κυττάρων τα οποία πυροδότησαν την εκάστοτε αφετηρία. Ως δεδομένα εξόδου, το μοντέλο υπολογίζει

την κατάσταση των αφετηριών (Pre-R, RB, RL, RR, Pass-R και Post-R) και τις χρονικές στιγμές κατά τις οποίες συμβαίνουν αλλαγές στην κατάσταση αυτή καθώς επίσης και τον αριθμό αντιγράφων που παράγονται σε κάθε περιοχή.

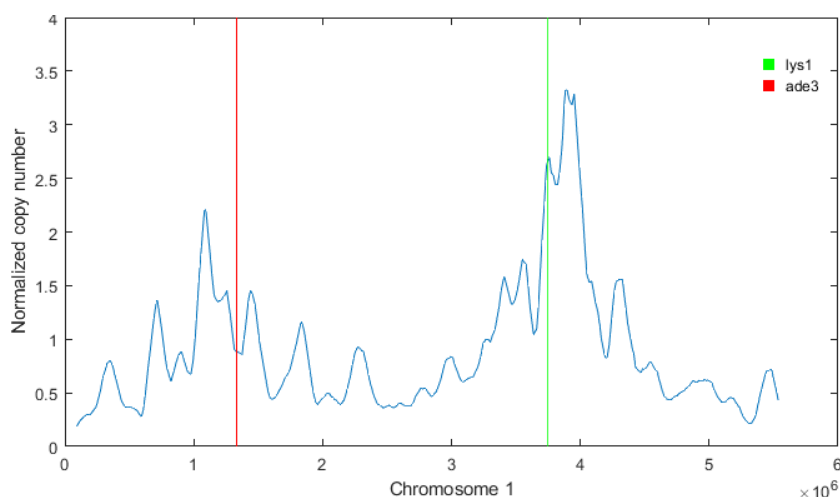
Η χρήση του μοντέλου για τον *S.pombe* επιτρέπει την μελέτη του φαινομένου της αντιγραφής σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων εφόσον κάθε προσομοίωση αντιστοιχεί σε μια μοναδική αλληλουχία γεγονότων η οποία θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα κύτταρο του πληθυσμού. Η μελέτη συγκεκριμένων περιοχών σε επίπεδο μεμονωμένων προσομοιώσεων υπέδειξε την ύπαρξη ετερογένειας ως προς τα επίπεδα επαναντιγραφής. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.1 κάθε προσομοίωση δύναται να εμφανίζει τελείως διαφορετικό πρότυπο ως προς τον αριθμό αντιγράφων που παράγονται σε κάθε περιοχή. Η ετερογένεια αυτή προκύπτει λόγω της στοχαστικότητας που χαρακτηρίζει την πυροδότηση των αφετηριών. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη υπολογίστηκαν οι κατανομές του αριθμού των αντιγράφων συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος που περιλάμβαναν μία αφετηρία είτε υψηλής είτε χαμηλής απόδοσης. Και στις δυο περιπτώσεις οι κατανομές αυτές εμφανίζουν θετική ασυμμετρία, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ετερογένειας.



Εικόνα 4.1 Μελέτη μεμονωμένων προσομοιώσεων υποδεικνύει την ύπαρξη ετερογένειας στον αριθμό αντιγράφων που παράγονται κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Αριστερά παρουσιάζονται οι κατανομές του αριθμού αντιγράφων DNA από 4 μεμονωμένες προσομοιώσεις του μοντέλου της επαναντιγραφής και αφορούν σε τμήμα του χρωμοσώματος *I* μεγέθους 1Mb. Η ετερογένεια στον αριθμό αντιγράφων πιθανά προκύπτει από τη στοχαστικότητα της πυροδότησης των αφετηριών (δεξιά).

Σε επίπεδο κυττάρων, παρατηρείται επιπλέον ετερογένεια μεταξύ των προφίλ επαναντιγραφής διαφορετικών κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι μια περιοχή σε επίπεδο πληθυσμού μπορεί να υπέρ-αντιγράφεται, ωστόσο θα υπάρχουν κύτταρα μέσα στον ίδιο πληθυσμό στα οποία η περιοχή αυτή θα εμφανίζει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων. Αντίθετα, μια περιοχή που δεν επαναντιγράφεται έντονα σε επίπεδο πληθυσμού, μπορεί εμφανίζεται σημαντικά ενισχυμένη σε ορισμένα κύτταρα του πληθυσμού αυτού. Με βάση την παρατήρηση αυτή που προκύπτει από τα *in silico* δεδομένα του μοντέλου, προχωρήσαμε σε πειραματική επιβεβαίωση της ύπαρξης ετερογένειας στο προφίλ επαναντιγραφής συγκεκριμένων θέσεων στο γονιδίωμα του *S.pombe*.

Η διερεύνηση της ετερογένειας, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, ως προς το αριθμό αντιγράφων που παράγονται κατά την επαναντιγραφή έγινε σε δύο διαφορετικές περιοχές του χρωμοσώματος I του *S.pombe*. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η περιοχή του γονιδίου *lys1+* που βρίσκεται στη θέση ChrI:3743421 ανάμεσα σε δύο θέσεις έναρξης με υψηλές αποδοτικότητες (60% και 39%), καθώς και η περιοχή του γονιδίου *ade3+* που βρίσκεται στη θέση ChrI:1333233 μεταξύ δύο μη αποδοτικών θέσεων έναρξης της αντιγραφής (13% και 17%). Στην εικόνα 4.2 παρουσιάζεται ο αριθμός αντιγράφων κατά μήκος του χρωμοσώματος I, σύμφωνα με τα *in silico* δεδομένα. Για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων κάθε περιοχής χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος 100 προσομοιώσεων. Με πράσινο και κόκκινο επισημαίνονται τα γονίδια *lys1+* και *ade3+* αντίστοιχα.

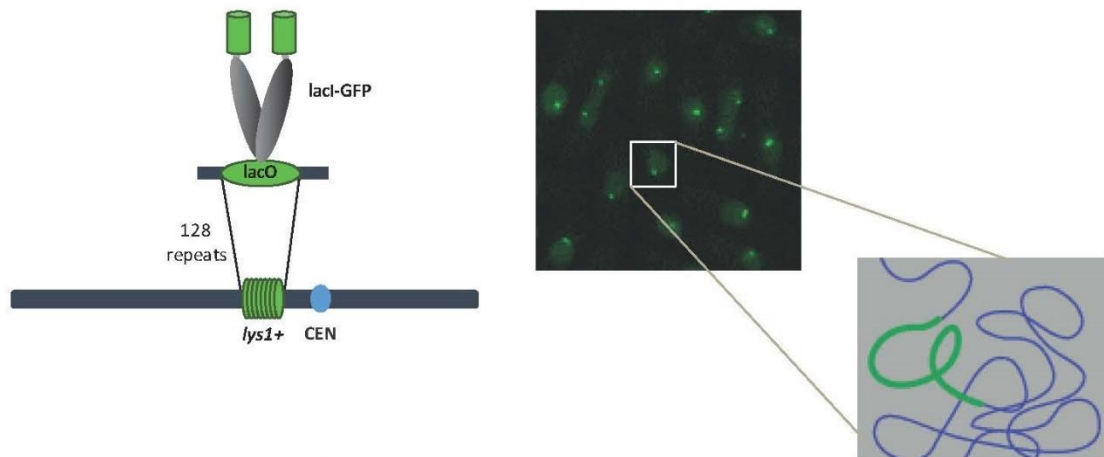


Εικόνα 4.2 Επίπεδα επαντιγραφής του χρωμοσώματος I σύμφωνα με τα *in silico* δεδομένα. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο κανονικοποιημένος, ως προς το μέσο όρο, αριθμός αντιγράφων του χρωμοσώματος I. Με πράσινο και κόκκινο επισημαίνονται τα γονίδια *lys1+* και *ade3+* αντίστοιχα.

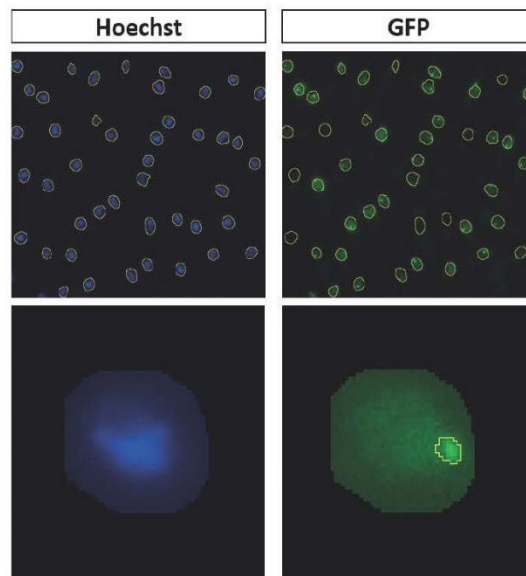
4.1.1.1 Οπτικοποίηση του περιεχόμενου DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων

Για την σήμανση και οπτικοποίηση των περιοχών του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρουν, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα LacO/LacI. Η αλληλουχία LacO αποτελεί μέρος του οπερονίου της λακτόζης του οργανισμού *E.coli* και αναγνωρίζεται από τον καταστολέα LacI. Η ενσωμάτωση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών LacO μπορεί να γίνει σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα ευκαρυωτικών κυττάρων που έχουν τροποποιηθεί ώστε να εκφράζουν την πρωτεΐνη LacI σημασμένη με την πρωτεΐνη GFP (εικόνα 4.3 A). Η πρόσδεση του LacI-GFP στον καταστολέα LacO οδηγεί στη στρατολόγηση μορίων GFP σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος επιτρέποντας την οπτικοποίησή τους με μικροσκόπιο φθορισμού. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων αυτών, διακρίνονται εστίες φθορισμού που αντιστοιχούν στον γενετικό τόπο που έχει σημειωθεί (εικόνα 4.3 B). Τεχνικές ανάλυσης εικόνας επιτρέπουν τον υπολογισμό της έντασης φθορισμού των εστιών, η οποία αντικατοπτρίζει το αριθμό των αντιγράφων της σημασμένης περιοχής. Η σήμανση περιοχών του DNA με το σύστημα LacO/LacI έχει χρησιμοποιηθεί στον *Saccharomyces cerevisiae* προκειμένου να μελετηθεί η δυναμική της αντιγραφής του DNA [179]. Κατά τη μελέτη αυτή η ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος του LacI-GFP χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανιχνευτεί το χρονικό σημείο του διπλασιασμού των σημασμένων περιοχών σε μεμονωμένα κύτταρα.

A



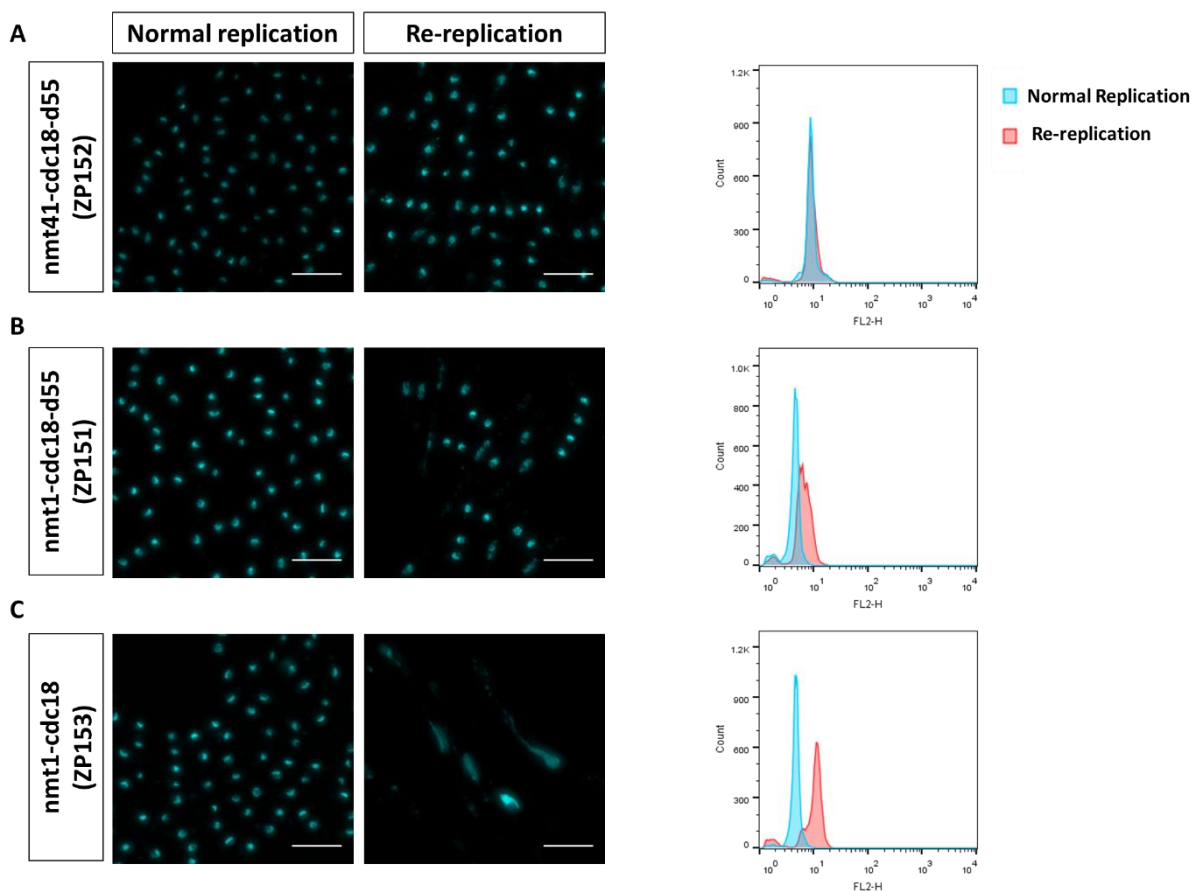
B



Εικόνα 4.3 Οπτικοποίηση των επιπέδων της επαναντιγραφής κυττάρων *S.pombe*. Η περιοχή ενδιαφέροντος σημάνθηκε με την ενσωμάτωση αλληλουχιών LacO σε κύτταρα *S.pombe* που εκφράζουν LacI-GFP. Η πρόσδεση του LacI-GFP στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες LacO επιτρέπει την οπτικοποίηση των σημασμένων περιοχών με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού **(A)**. Τεχνικές ανάλυσης εικόνας επιτρέπουν την ανίχνευση μεμονωμένων πυρήνων αλλά και των εστιών φθορισμού που περιέχει καθένας από αυτούς **(B)**. Οι περιοχές που αναγνωρίζονται ως πυρήνες (πάνω) και ως εστίες φθορισμού (κάτω) επισημαίνονται με κίτρινο περίγραμμα.

Για την επαγωγή της επαντιγραφής χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *cdc18* υπό τον έλεγχο του επαγόμενου υποκινητή nmt. Υπάρχουν διαθέσιμα διαφορετικά στελέχη τα οποία διαφέρουν ως προς την ισχύ του υποκινητή nmt είτε ως προς τη σταθερότητα της

πρωτεΐνης Cdc18 και κατ' επέκταση παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα επαναντιγραφής του DNA. Αρχικά λοιπόν, μελετήθηκε η επαγωγή της επαναντιγραφής του DNA σε τρία διαφορετικά στελέχη. Το πρώτο στέλεχος (ZP152) περιλαμβάνει τη μεταλλαγμένη μορφή *cdc18-d55* υπό τον έλεγχο του μεσαίας ισχύος *nmt41*. Η *μετάλλαξη cdc18-d55* αποτελεί μία μεταλλαγμένη μορφή του αδειοδοτικού παράγοντα Cdc18 στην οποία έχουν αφαιρεθεί τα αμινοξέα 1-149. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει πέντε κατάλοιπα θρεονίνης (στις θέσεις 10, 46, 60, 104, 134) που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης και η απουσία αυτών συμβάλλει στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης [180]. Το δεύτερο στέλεχος περιλαμβάνει επίσης τη μετάλλαξη *cdc18-d55* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή *nmt1* και το τρίτο φέρει το αγρίου τύπου *cdc18* υπό τον *nmt1*. Η επαγωγή των *nmt* υποκινητών πραγματοποιήθηκε με καλλιέργεια των στελεχών σε θρεπτικό που δεν περιέχει θειαμίνη για 21 ώρες. Ο προσδιορισμός του περιεχόμενου DNA έγινε με κυτταρομετρία ροής, ενώ επίσης τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από χρώση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst.



Εικόνα 4.4 Επαγωγή επαναντιγραφής σε κύτταρα *S.pombe*. Αριστερά απεικονίζονται οι πυρήνες των διαφορετικών στελεχών σε συνθήκες που επιτρέπουν τη φυσιολογική αντιγραφή ή την επαναντιγραφή. Το στέλεχος ZP152 (**A**) διαθέτει τη μεταλλαγμένη μορφή *cdc18-d55* υπό τον υποκινητή *nmt41* επαγωγή και δεν πραγματοποιεί επαναντιγραφή στις 21 ώρες επαγωγής. Το στέλεχος ZP151 (**B**) φέρει την ίδια μετάλλαξη του *cdc18* υπό το ισχυρό υποκινητή *nmt1* και υπόκειται σε επαναντιγραφή του DNA όπως φαίνεται και από την αύξηση τους περιεχόμενου DNA (δεξιά). Το στέλεχος ZP153 (**C**) διαθέτει το αγρίου τύπου *cdc18* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή και πραγματοποιεί έντονη επαναντιγραφή που ακολουθείται από θραυσματοποίηση των πυρήνων (αριστερά) και μεγαλύτερη αύξηση του περιεχόμενου DNA. (Scale bar: 10μm)

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε πως στις 21 ώρες επαγωγής το στέλεχος *nmt41-cdc18-d55* (ZP152) δεν πραγματοποιεί επαναντιγραφή, σε αντίθεση με τα στελέχη *nmt1-cdc18-d55* (ZP151) και *nmt1-cdc18* (ZP153) τα οποία αυξάνουν το περιεχόμενο DNA τους (εικόνα 4.4). Επιπλέον παρατηρήθηκε πως το στέλεχος *nmt1-cdc18* προχωράει σε εντονότερη επαναντιγραφή η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη επιβίωση των κυττάρων και την θραυσματοποίηση των πυρήνων που καθιστά αδύνατη την αναγνώριση πυρήνων κατά την ανάλυση εικόνων. Για την ανάλυση του περιεχόμενου DNA και τη σχετική ποσοτικοποίηση της επαναντιγραφής

συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ZP151 το οποίο πραγματοποιεί αύξηση του περιεχόμενου DNA, ενώ παράλληλα τα κύτταρα διατηρούν την ακεραιότητα των πυρήνων τους.

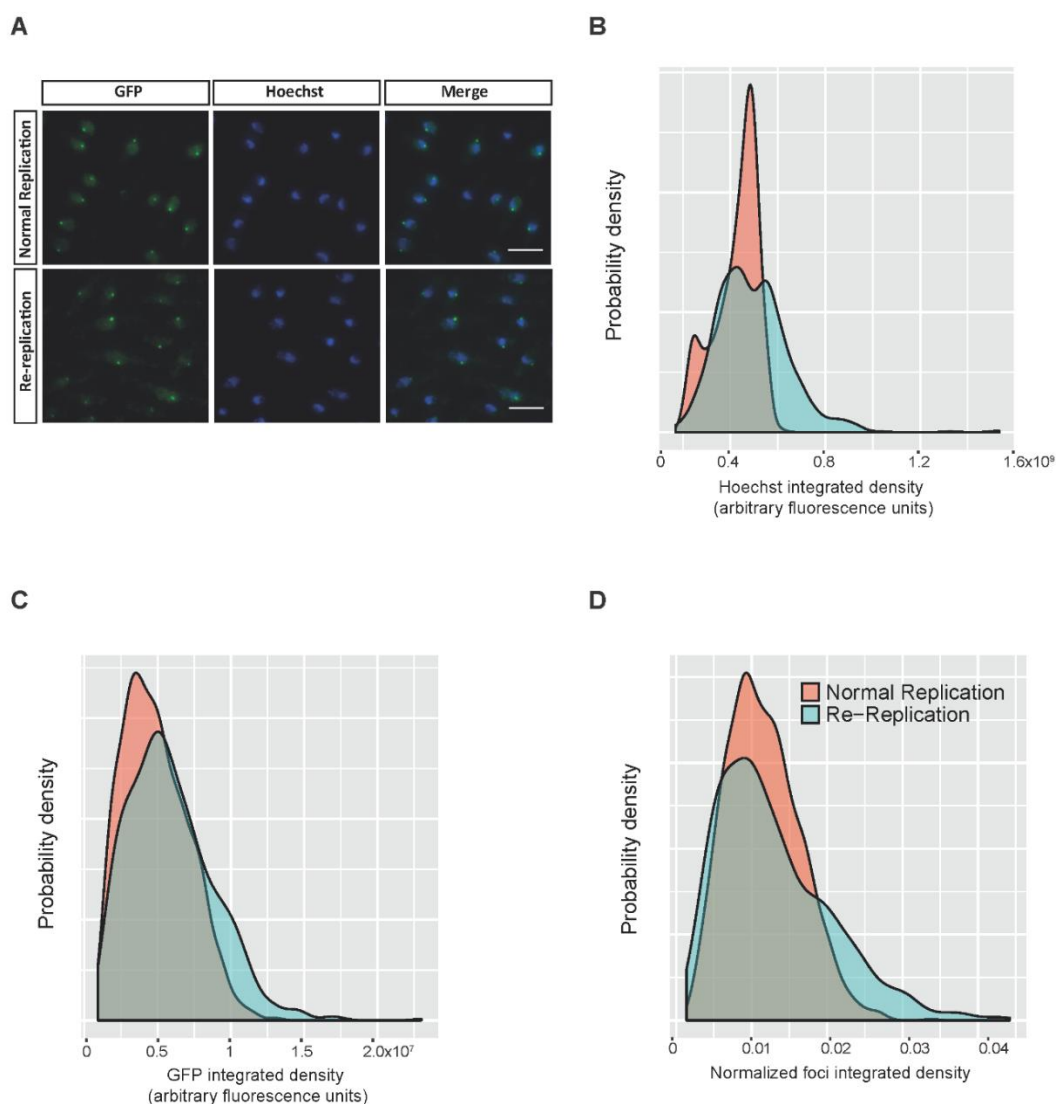
4.1.1.2 Η επαναντιγραφή του DNA εμφανίζει ετερογένεια σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων

Γενετικός τύπος *lys1*

Για την ποσοτικοποίηση της επαναντιγραφής σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στελέχους ZP295 το οποίο έχει προκύψει από διασταύρωση του στελέχους ZP151 (*nmt1-cdc18-d55*) φέρει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες LacO δίπλα στο γονίδιο *lys1+*, ενώ εκφράζει ιδιοστατικά την υβριδική πρωτεΐνη LacI-GFP [181]. Κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C παρουσία θειαμίνης (+T), με σκοπό την καταστολή της έκφρασης του *cdc18-d55*, αποτέλεσαν το δείγμα ελέγχου. Η επαγωγή της επαναντιγραφής έγινε με απομάκρυνση της θειαμίνης από το θρεπτικό μέσο και καλλιέργεια των κυττάρων (-T) για 30 ώρες στους 25°C. Η καλλιέργεια των κυττάρων κάτω από αυτές τις συνθήκες πραγματοποιήθηκε ώστε να βελτιστοποιηθεί η εικόνα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, καθώς αποτρέπεται η θραυσματοποίηση των πυρήνων, ενώ παράλληλα οι εστίες φθορισμού του GFP είναι περισσότερο ευδιάκριτες. Ακολούθησε η λήψη εικόνων σε μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου και ανάλυση εικόνας με το λογισμικό ImageJ. Ο διαχωρισμός των πυρήνων έγινε με βάση τη χρώση της Hoechst, ενώ στη συνέχεια σε κάθε πυρήνα ανιχνεύτηκαν οι εστίες φθορισμού GFP. Για τον προσδιορισμό των συνολικών επιπέδων της επαναντιγραφής του γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκε η ολοκληρωμένη πυκνότητα (integrated density) του καναλιού της Hoechst (εικόνα 4.5 A) η οποία αντιπροσωπεύει το σύνολο των τιμών των εικονοστοιχείων της περιοχής που μας ενδιαφέρει και ισούται με την επιφάνεια της περιοχής αυτής επί τη μέση ένταση όλων των εικονοστοιχείων της επιφάνειας. Επιπλέον υπολογίστηκε το integrated density του καναλιού GFP (εικόνα 4.5 B). Για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων επαναντιγραφής της περιοχής *lys1+* χρησιμοποιήθηκε το integrated density του καναλιού GFP κανονικοποιημένο ως προς το αντίστοιχο

integrated density της Hoechst προκειμένου να συνυπολογίσουμε το περιεχόμενο DNA του κάθε κυττάρου (εικόνα 4.5 C).

Η κατανομή της Hoechst των κυττάρων που πραγματοποιούν φυσιολογική αντιγραφή (εικόνα 4.5 B) παρουσιάζει μια μικρή κορυφή σε χαμηλές τιμές Hoechst που αντιστοιχεί σε πυρήνες που βρίσκονται στη G1 φάση του κυτταρικού τους κύκλου και μια μεγάλη κορυφή σε υψηλότερες τιμές της Hoechst που αντιστοιχεί στους πυρήνες που βρίσκονται στη G2 φάση. Κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής στο στέλεχος αυτό η κατανομή της Hoechst δείχνει ότι απουσιάζουν οι πυρήνες στη G1 φάση, ενώ ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού αποκτά περιεχόμενο DNA μεγαλύτερο από αυτό της G2 φάσης. Η σύγκριση των κατανομών της Hoechst των δύο πληθυσμών (Normal replication και Re-replication) υποδεικνύει αύξηση της τιμής της διαμέσου των κυττάρων που υπόκεινται σε επαναντιγραφή, η οποία σύμφωνα με την δοκιμή Mann-Whitney είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0.0001$). Αντίστοιχη αύξηση της διαμέσου παρατηρείται και στην περίπτωση του GFP (Πίνακας 4.1). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει ότι κατά την υπερέκφραση του *cdc18-d55* τα κύτταρα προχωρούν σε επαναντιγραφή και αύξηση του συνολικού τους DNA. Συγκρίνοντας τις κατανομές των κανονικοποιημένων τιμών του GFP παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη διάμεσο. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα επαναντιγραφής της περιοχής *lys1+* είναι ανάλογα των επιπέδων επαναντιγραφής του γονιδιώματος.



Εικόνα 4.5 Ποσοτικοποίηση της περιοχής του *lys1+* γονιδίου σε συνθήκες φυσιολογικής αντιγραφής και επαναντιγραφής. (Α) Οπτικοποίηση του συνολικού DNA και της σημασμένης με GFP περιοχής του γονιδίου *lys1+*, κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες που επιτρέπουν τη φυσιολογική αντιγραφή του γονιδιώματος (Normal replication) ή την επαναντιγραφή (Re-replication) (Scale bar: 5μm). **(Β-Δ)** Ιστογράμματα των integrated density των καναλιών Hoechst (Β) και GFP (C) καθώς και του κανονικοποιημένου integrated density των εστιών GFP (D). Για την ποσοτικοποίηση αναλύθηκαν $n_1=1571$ κύτταρα που πραγματοποιούσαν φυσιολογική αντιγραφή και $n_2=1158$ κύτταρα στα οποία είχε γίνει επαγωγή επαναντιγραφής.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε το βαθμό ετερογένειας που υπάρχει στις κατανομές των κανονικοποιημένων τιμών του GFP των κυττάρων κατά τη φυσιολογική αντιγραφή και κατά την επαναντιγραφή χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μετρικές: η ασυμμετρία ή λοξότητα (Skewness), το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR)

και ο συντελεστής διακύμανσης (CV). Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία των κατανομών των κανονικοποιημένων τιμών του GFP, καθώς και οι προαναφερθείσες μετρικές.

Η κατανομή των κανονικοποιημένων τιμών του GFP των κυττάρων που υπόκεινται σε επαναντιγραφή (re-replication) φαίνεται να αποκλίνει από τη συμμετρία. Συγκριμένα, παρουσιάζει αυξημένη θετική ασυμμετρία και χαρακτηριστικό «άπλωμα» των τιμών προς τα δεξιά σε σχέση με την κατανομή των κυττάρων που πραγματοποιούν φυσιολογικά αντιγραφή (normal replication). Η διαφορά αυτή αντικατοπτρίζεται και στην αύξηση του βαθμού ασυμμετρίας από 0.4996 για τη φυσιολογική αντιγραφή σε 0.9947 για την επαναντιγραφή. Επιπλέον αύξηση παρατηρείται και στο ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR) της κατανομής (IQR=0.006715 για τα φυσιολογικά κύτταρα και IQR=0.010323 για τα κύτταρα στα οποία έχει επαχθεί επαναντιγραφή). Υπολογίζοντας τον συντελεστή διασποράς (CV) παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που πραγματοποιούν επαναντιγραφή εμφανίζουν αυξημένο CV (CV=57.79%) σε σύγκριση με τα κύτταρα που πραγματοποιούν φυσιολογική αντιγραφή του DNA τους (CV=41.51%). Η διαφορά στις διασπορές των δύο πληθυσμών είναι στατιστικά σημαντική με βάση τη δοκιμή Levene ($\text{Pr}(> F) = 2.2 \times 10^{-6}$). Οι μετρήσεις αυτές ενισχύουν την ύπαρξη ετερογένειας, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, στον αριθμό αντιγράφων της περιοχής *lys1+* υπό συνθήκες επαγωγής της επαναντιγραφής.

Πίνακας 4.1 Στατιστικά στοιχεία κατανομών Hoechst και GFP.

	Hoechst		GFP	
	Normal replication	Re-replication	Normal replication	Re-replication
Αριθμός κυττάρων	1571	1158	1571	1158
Ελάχιστη τιμή	1.89×10^8	1.70×10^8	0.92×10^6	1.06×10^6
25% εκατοστημόριο	3.65×10^8	3.87×10^8	3.14×10^6	3.70×10^6
Διάμεσος	4.50×10^8	4.76×10^8	4.62×10^6	5.49×10^6
75% εκατοστημόριο	4.93×10^8	5.78×10^8	6.40×10^6	7.62×10^6
Μέγιστη τιμή	1.01×10^9	1.53×10^9	1.32×10^7	2.30×10^7
Μέσος όρος	4.23×10^8	4.95×10^8	4.87×10^6	5.88×10^6

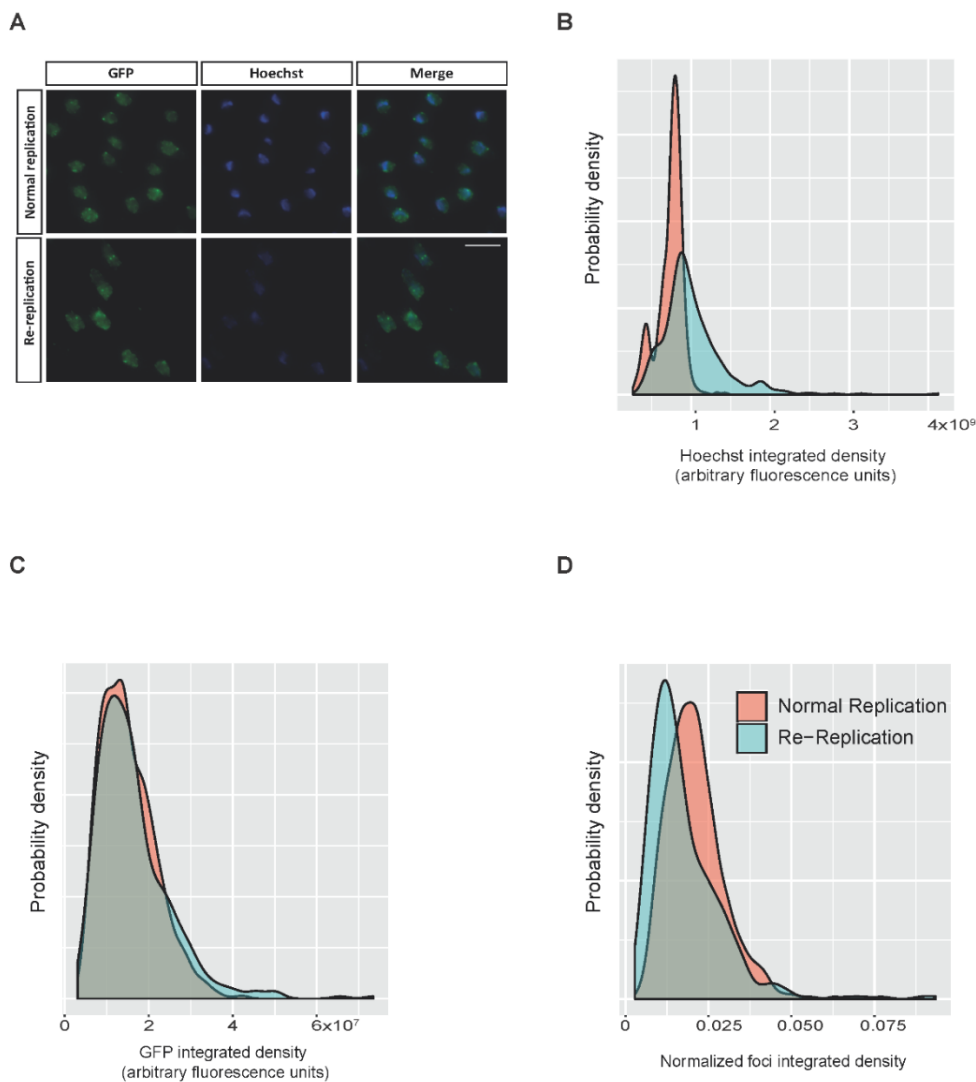
Πίνακας 4.2 Στατιστικά στοιχεία της κατανομής των κανονικοποιημένων τιμών του GFP.

	Normal replication	Re-replication
Αριθμός κυττάρων	1571	1158
Ελάχιστη τιμή	0.002034	0.001348
25% εκατοστημόριο	0.008065	0.007227
Διάμεσος	0.01112	0.01124
75% εκατοστημόριο	0.01478	0.01755
Μέγιστη τιμή	0.03383	0.04421
Μέσος όρος	0.01159	0.01297
Συντελεστής διακύμανσης	41.51%	57.79%
Ασυμμετρία	0.4996	0.9947
Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	0.006715	0.010323

Τέλος, υπολογίστηκε η συσχέτιση μεταξύ της έντασης της Hoechst και του GFP. Φυσιολογικά, καθώς τα κύτταρα διπλασιάζουν το συνολικό τους DNA (το οποίο αντιπροσωπεύεται από τη Hoechst), διπλασιάζουν και την περιοχή του *lys1+* γονιδίου. Έτσι λοιπόν σε κύτταρα που επιτελούν φυσιολογικά την αντιγραφή του DNA τους, αναμένεται να υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της Hoechst και του GFP. Για τον υπολογισμό της συσχέτισης στα κύτταρα του στελέχους ZP295 χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Spearman, ο οποίος παίρνει τιμές από -1 (όταν υπάρχει απόλυτα αρνητική συσχέτιση) έως 1 (όταν υπάρχει απόλυτα θετική συσχέτιση). Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία θειαμίνης και πραγματοποιούσαν φυσιολογική αντιγραφή εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ Hoechst και GFP (Spearman=0.3371, p-value<0.0001). Αντιθέτως, στα κύτταρα που υπόκεινται σε επαναντιγραφή του DNA δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ Hoechst και GFP (Spearman=-0.03583, p-value=0.2231). Η απώλεια της συσχέτισης αυτής κατά την επαναντιγραφή αποτελεί ακόμα μία ένδειξη ετερογένειας.

Γενετικός τόπος *ade3*

Αντίστοιχα με την περιοχή του γονιδίου *lys1*, έγινε ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων επαναντιγραφής του γενετικού τόπου *ade3* σε επίπεδο κυττάρου. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ZP269 το οποίο φέρει τις LacO αλληλουχίες στην περιοχή του *ade3* γονιδίου και το γονίδιο *cdc18-d55* κάτω από τον *hmt1* υποκινητή. Ομοίως με το στέλεχος ZP295, τα κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C παρουσία θειαμίνης αποτέλεσαν το δείγμα ελέγχου. Η επαγωγή της επαναντιγραφής έγινε με απομάκρυνση της θειαμίνης από το θρεπτικό μέσο και καλλιέργεια των κυττάρων (-T) για 30 ώρες στους 25°C. Στην εικόνα 4.6 παρουσιάζονται οι κατανομές των σημάτων της Hoechst και του GFP καθώς και του GFP κανονικοποιημένου ως προς τη Hoechst, ενώ στους πίνακες 4.3 και 4.4 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία των κατανομών.



Εικόνα 4.6 Ποσοτικοποίηση της περιοχής του *ade3* γονιδίου σε συνθήκες φυσιολογικής αντιγραφής και επαναντιγραφής. (Α) Οπτικοποίηση του συνολικού DNA και της σημασμένης με GFP περιοχής του γονιδίου *ade3*, κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες που επιτρέπουν τη φυσιολογική αντιγραφή του γονιδιώματος (Normal replication) ή την επαναντιγραφή (Re-replication) (Scale bar: 5μm). **(Β-Δ)** Ιστογράμματα των integrated density των καναλιών Hoechst (Β) και GFP (C) καθώς και του κανονικοποιημένου integrated density των εστιών GFP (D).

Η κατανομή της Hoechst των κυττάρων που πραγματοποιούν φυσιολογική αντιγραφή παρουσιάζει και πάλι δύο κορυφές που αντιστοιχούν στις φάσεις G1 και G2 του κυτταρικού κύκλου. Η επαγωγή της επαναντιγραφής έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της κορυφής που αντιστοιχεί στη G1 φάση. Από σύγκριση των κατανομών της Hoechst των δύο πληθυσμών (εικόνα 4.6 Β) και συγκεκριμένα των διαμέσων, φαίνεται ότι τα κύτταρα που υπόκεινται σε επαναντιγραφή, παρουσιάζουν αυξημένο συνολικό DNA. Η αύξηση αυτή σύμφωνα με την δοκιμή Mann-Whitney είναι

στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0.0001$). Συγκρίνοντας τις κατανομές του GFP (εικόνα 4.6 C) δεν προκύπτει στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη διάμεσο, ωστόσο μετά την κανονικοποίηση του GFP (εικόνα 4.6 D) παρατηρούμε μία στατιστικά σημαντική μείωση της διαμέσου ($p\text{-value} < 0.0001$) στα κύτταρα που πραγματοποιούν επαναντιγραφή. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με το γεγονός ότι το γονίδιο *ade3+* βρίσκεται μεταξύ δύο μη αποδοτικών θέσεων και αναμένεται να έχει χαμηλά επίπεδα επαναντιγραφής σε σχέση με το μέσο όρο του συνολικού DNA.

Κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη ετερογένεια ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του γενετικού τόπου *ade3+* που αντιπροσωπεύεται από το κανονικοποιημένο integrated density των εστιών GFP. Συγκεκριμένα η κατανομή των κυττάρων που υπόκεινται σε επαναντιγραφή παρουσιάζει αυξημένη θετική ασυμμετρία και αυξημένο ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR) (Πίνακας 4.4). Επιπλέον, υπολογίστηκε ο συντελεστής διασποράς (CV), ο οποίος παρουσιάζει αύξηση στα κύτταρα που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (CV=63.97%) σε σύγκριση με τα κύτταρα που πραγματοποιούν φυσιολογική αντιγραφή του DNA τους (CV=41.15%). Η διαφορά στις διασπορές των δύο πληθυσμών είναι στατιστικά σημαντική με βάση τη δοκιμή Levene ($\text{Pr}(> F) = 0.003204$). Οι μετρήσεις αυτές δείχνουν ότι κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής υπάρχει ετερογένεια, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, στον αριθμό αντιγράφων της περιοχής *ade3+*.

Πίνακας 4.3 Στατιστικά στοιχεία κατανομών Hoechst και GFP

	Hoechst		GFP	
	Normal replication	Re-replication	Normal replication	Re-replication
Αριθμός κυττάρων	1065	441	1065	441
Ελάχιστη τιμή	2.61×10^8	3.53×10^8	3.07×10^6	3.315×10^6
25% εκατοστημόριο	6.60×10^8	7.94×10^8	1.00×10^7	1.01×10^7
Διάμεσος	7.71×10^8	9.29×10^8	1.40×10^7	1.43×10^7

75% εκατοστημόριο	8.36×10^8	1.16×10^9	1.91×10^7	2.02×10^7
Μέγιστη τιμή	1.44×10^9	4.13×10^9	4.28×10^7	7.343×10^7
Μέσος όρος	7.35×10^8	1.01×10^9	1.51×10^7	1.63×10^7

Πίνακας 4.4 Στατιστικά στοιχεία της κατανομής των κανονικοποιημένων τιμών του GFP.

	Normal replication	Re-replication
Αριθμός κυττάρων	1065	441
Ελάχιστη τιμή	0.003015	0.00283
25% εκατοστημόριο	0.01495	0.01041
Διάμεσος	0.01998	0.01482
75% εκατοστημόριο	0.02553	0.02276
Μέγιστη τιμή	0.07641	0.09342
Μέσος όρος	0.02095	0.01781
Συντελεστής διακύμανσης	41.15%	63.97%
Ασυμμετρία	1.103	2.455
Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	0.01058	0.01235

Αντίστοιχα με το γενετικό τόπο *lys1+*, υπολογίστηκε η συσχέτιση μεταξύ της έντασης της Hoechst και του GFP και για τον γενετικό τόπο *ade3+*. Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι τα κύτταρα που πραγματοποιούν φυσιολογική αντιγραφή εμφανίζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ Hoechst και GFP (Spearman=0.3675, p-value<0.0001), Αντιθέτως, στα κύτταρα που υπόκεινται σε επαναντιγραφή του DNA υπάρχει μειωμένη θετική συσχέτιση μεταξύ Hoechst και GFP (Spearman=0,1565, p-value=0.001). Η μείωση της συσχέτισης μεταξύ των εντάσεων της Hoechst και του GFP κατά την επαναντιγραφή αποτελεί ακόμα μία ένδειξη ετερογένειας, ενώ το γεγονός ότι στην περίπτωση του *ade3+* γενετικού τόπου η συσχέτιση δεν χάνεται τελείως κατά την επαναντιγραφή μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό κυττάρων που αναλύθηκαν.

Παρατηρούμε λοιπόν, ότι η διαδικασία της επαναντιγραφής εμφανίζει ετερογένεια σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, επιβεβαιώνοντας την πρόβλεψη του μοντέλου της επαναντιγραφής. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να αποτελέσει μηχανισμό εξέλιξης των

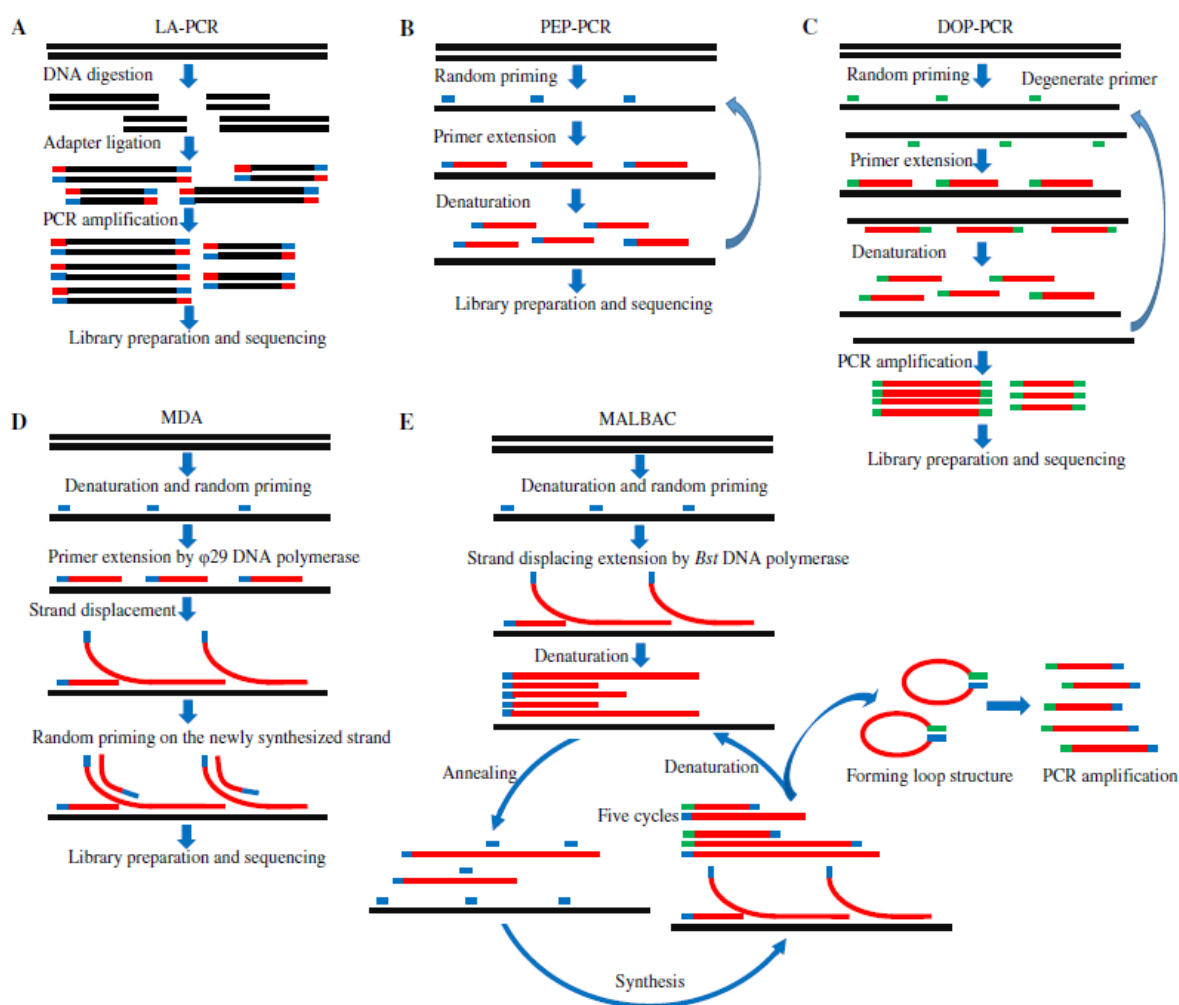
κυττάρων καθώς συμβάλλει στη γονιδιακή πλαστικότητα και τη δημιουργία νέων πολλαπλών γονοτύπων.

4.1.2 Μελέτη της επαναντιγραφής σε επίπεδο κυττάρων με αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος

Η μελέτη συγκεκριμένων περιοχών σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων υπέδειξε την ύπαρξη ετερογένειας ως προς τον αριθμό αντιγράφων που παράγονται κατά την επαναντιγραφή. Ωστόσο η προσέγγιση αυτή δε δίνει πληροφορία για τον βαθμό ετερογένειας κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος. Η ανάπτυξη τεχνικών που επιτρέπουν την αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) μεμονωμένων κυττάρων επιτρέπει την ανάλυση των προφίλ επαναντιγραφής αυτών. Περαιτέρω ανάλυση των γονιδιωματικών προφίλ σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων μπορεί να αναδείξει διαφορετικές ομάδες κυττάρων του πληθυσμού που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά πρότυπα επαναντιγραφής. Επίσης προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών περιοχών, όπου η ενίσχυση ενός τόπου μπορεί να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την ενίσχυση μίας απομακρυσμένης περιοχής του γονιδιώματος.

Η διαδικασία της αλληλούχισης ξεκινά με την απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων και τη λύση τους προκειμένου να απελευθερωθεί το γονιδίωμά τους. Ένα κύτταρο ανθρώπου περιέχει περίπου 6 pg DNA και ένα κύτταρο *S.pombe* διαθέτει κατά μέσο όρο 33.8 fg DNA, ενώ για την διαδικασία της αλληλούχισης απαιτείται αρχική ποσότητα περίπου 50 ng. Προκειμένου να παραχθεί επαρκής ποσότητα DNA από ένα κύτταρο λοιπόν, μετά τη λύση ακολουθεί η ενίσχυση πλήρους γονιδιώματος (Whole Genome Amplification, WGA). Υπάρχουν τρεις βασικές προσεγγίσεις για την ενίσχυση πλήρους γονιδιώματος από μεμονωμένα κύτταρα: α) μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), β) μέθοδοι που πραγματοποιούν ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλών μεταθέσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA) και γ) η μέθοδος Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycle (MALBAC).

Οι μεθοδολογίες που βασίζονται στην PCR χωρίζονται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες: α) την PCR με χρήση συνδετικού προσαρμογέα (Linker-Adaptor PCR, LA-PCR), β) τη μέθοδο προενίσχυσης με επέκταση εκκινητών (Primer Extension Pre-amplification, PEP-PCR) και γ) την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση εκφυλισμένων εκκινητών (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR, DOP-PCR). Στην εικόνα 4.7 παρουσιάζονται σχηματικά οι διαφορετικές μεθοδολογίες ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος, ενώ περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 3.4.2 (Υλικά & Μέθοδοι).



Εικόνα 4.7 Μέθοδοι ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος. **A)** Η μέθοδος LA-PCR περιλαμβάνει κατάτμηση του γονιδιώματος με ένζυμο περιορισμού ενώ στη συνέχεια στα τμήματα που προκύπτουν ακολουθεί προσθήκη ειδικών αλληλουχιών με αντίδραση λιγάσης. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για την ομοιόμορφη ενίσχυση των τμημάτων DNA με PCR. **B)** Κατά την PEP-PCR γίνεται τυχαίος τεμαχισμός του αρχικού DNA, ενώ ακολουθεί ενίσχυση των τμημάτων με χρήση τυχαίων 6-νουκλεοτιδικών εκκινητών. **C)** Η DOP-PCR περιλαμβάνει αρχικά την ενίσχυση με εκφυλισμένους εκκινητές που φέρουν ειδικές αλληλουχίες στο ένα άκρο τους. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται

για το δεύτερο βήμα ενίσχυσης με PCR όπου αναγνωρίζονται από ειδικούς εκκινητές. **D)** Η μέθοδος MDA βασίζεται στην ισοθερμική ενίσχυση. Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και ακολουθεί υβριδοποίηση τυχαίων εκκινητών και σύνθεση του DNA από την Φ29 πολυμεράση η οποία διαθέτει ικανότητα εκτόπισης κλώνου. **E)** Τέλος η μέθοδος MALBAC πραγματοποιεί γραμμική προενίσχυση του DNA που βασίζεται στην MDA με τη χρήση της Bst DNA πολυμεράσης και στη συνέχεια ακολουθεί ενίσχυση που βασίζεται στην PCR. Κατά την ισόθερμη ενίσχυση παράγονται ημι-αμπλικόνια τα οποία ενισχύονται στη συνέχεια τρόπο με PCR σχηματίζοντας ολοκληρωμένα αμπλικόνια. Τα αμπλικόνια αυτά σχηματίζουν θηλιές εμποδίζοντας την επαναχρησιμοποίηση τους ως υπόστρωμα της PCR, με αποτέλεσμα τη γραμμική ενίσχυση του γονιδιώματος [182].

Η εφαρμογή της αλληλούχισης μεμονωμένων κυττάρων (Single-Cell Sequencing, SCS), για τον χαρακτηρισμό των γονιδιωμάτων των κυττάρων ενός πληθυσμού γίνεται όλο και πιο συχνή σε μελέτες καρκινικών κυττάρων [183, 184]. Ένα από τα κύρια αντικείμενα μελέτης είναι η ύπαρξη αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων (CNVs) κατά μήκος γονιδιωμάτων μεμονωμένων κυττάρων. Παρά τη διαδομένη χρήση της τεχνολογίας του SCS σε καρκινικά κύτταρα και κύτταρα θηλαστικών, η εφαρμογή της σε μικρότερα γονιδιώματα όπως αυτό του *S.pombe* εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Η πρώτη δυσκολία στην πειραματική πορεία που ακολουθείται βρίσκεται στο διαχωρισμό των μεμονωμένων κυττάρων σε ειδικό κυτταροδιαχωριστή. Λόγω της ύπαρξης του κυτταρικού τοιχώματος στον *S.pombe*, πριν το διαχωρισμό των κυττάρων πραγματοποιείται ενζυμική λύση του τοιχώματος και δημιουργία σφαιροπλάστων. Στο στάδιο αυτό, οι σφαιροπλάστες είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι με αποτέλεσμα η πίεση που τους ασκείται κατά τον διαχωρισμό τους στο sorter οδηγεί στη λύση των κυττάρων. Έτσι λοιπόν, ενδέχεται να προκύψουν δείγματα τα οποία είτε να μην περιέχουν κανένα κύτταρο, είτε να περιέχουν ένα κύτταρο μαζί με προσμίξεις από το γονιδίωμα άλλων κυττάρων της καλλιέργειας που έχουν υποστεί λύση. Μετά το διαχωρισμό των κυττάρων ακολουθεί η διαδικασία της ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος η οποία γενικά, παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία σε μολύνσεις. Εφόσον η καλλιέργεια των κυττάρων, η ενζυμική λύση τους αλλά και ο διαχωρισμός τους με τη χρήση κυτταροδιαχωριστή δεν πραγματοποιείται σε ειδικό χώρο αποκλειστικά για τον *S.pombe*, είναι πιθανή η μόλυνση των δειγμάτων από εξωγενείς παράγοντες. Το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του *S.pombe* δημιουργεί ένα επιπλέον εμπόδιο. Ένα ανθρώπινο κύτταρο διαθέτει γονιδίωμα μεγέθους ~6.400 Mb, ενώ ένα κύτταρο *S.pombe* μόλις 12,57 Mb. Στην περίπτωση μόλυνσης του δείγματος από ανθρώπινο DNA, κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος, το ανθρώπινο DNA είναι αυτό που θα ενισχυθεί τελικά, με αποτέλεσμα

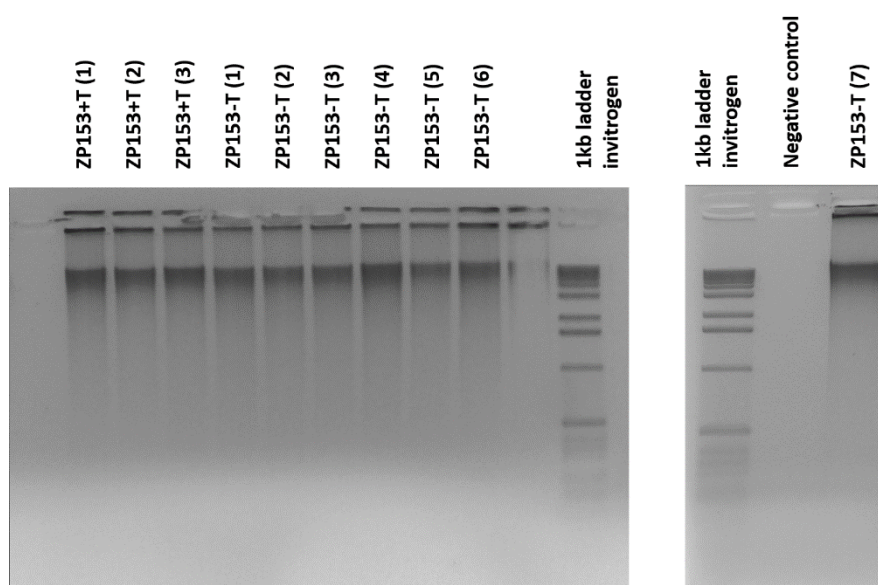
να μην υπάρχει επαρκής ποσότητα DNA του *S.pombe* ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία της αλληλούχησης.

4.1.2.1 Σύγκριση διαφορετικών μεθοδολογιών για την ενίσχυση γονιδιώματος

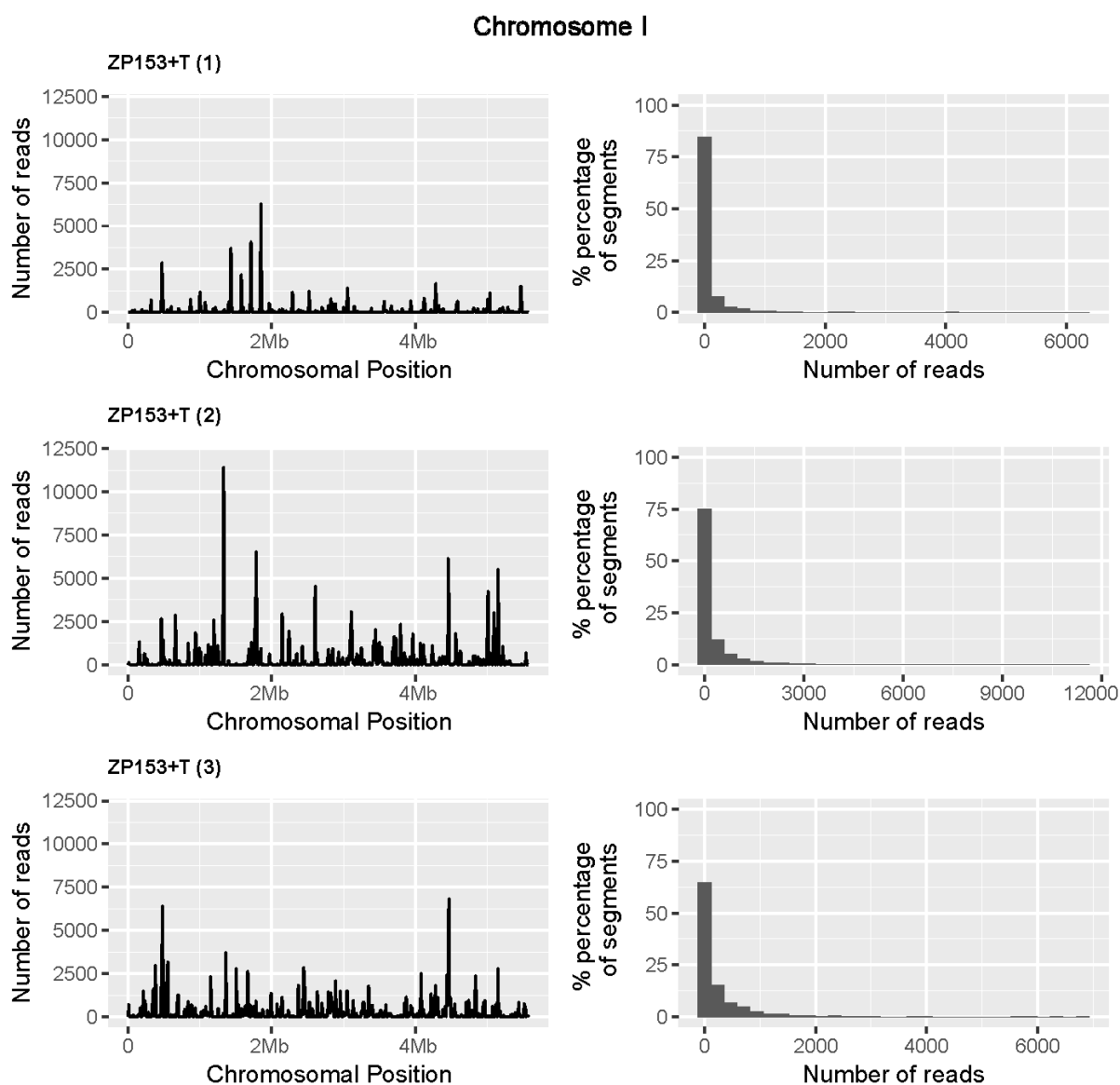
Γνωρίζοντας τις προκλήσεις που περιλαμβάνει η αλληλούχηση μεμονωμένων κυττάρων *S.pombe*, θελήσαμε στη συνέχεια να διερευνήσουμε τις διαθέσιμες μεθοδολογίες που υπάρχουν προκειμένου να μελετήσουμε το γονιδίωμα μεμονωμένων κυττάρων υπό συνθήκες φυσιολογικής αντιγραφής αλλά και επαναντιγραφής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ZP153 το οποίο φέρει το αγρίου τύπου αλληλόμορφο του *cdc18+* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nmt1*. Η επαγωγή της έκφρασης του *cdc18+* και κατ' επέκταση της επαναντιγραφής έγινε με καλλιέργεια των κυττάρων απουσία θειαμίνης για 21 ώρες, ενώ ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν για το ίδιο διάστημα σε θρεπτικό που περιείχε θειαμίνη. Μετά το πέρας των 21 ωρών, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε διαδικασία ενζυμικής λύσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, ώστε να δημιουργηθούν σφαιροπλάστες. Στη συνέχεια, διαχωρίστηκαν μοναδιαίοι σφαιροπλάστες με τη βοήθεια ειδικού κυτταροδιαχωριστή (Beckman Coulter MoFlo high speed sorter). Ακολούθησε λύση των σφαιροπλαστών και ενίσχυση του DNA. Για την ενίσχυση πλήρους γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα κιτ. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα REPLI-g (Qiagen), TruePrime (Sygnis) και GenomePlex (Sigma-Aldrich). Έπειτα έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί αν έχει γίνει επιτυχώς η ενίσχυση, καθώς και να προσδιοριστούν τα μεγέθη των μορίων που δημιουργήθηκαν. Η αλληλούχηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της πλατφόρμας Illumina MiSeq. Η ανάλυση των αρχείων bam που προέκυψαν μετά την αλληλούχηση έγινε με το πακέτο *cn.mops* του Bioconductor στην R [182]. Τα τρία χρωμοσώματα χωρίστηκαν σε τμήματα μεγέθους 5000 βάσεων και στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο αριθμός των διαβασμάτων (reads) για κάθε ένα από τα τμήματα αυτά.

REPLI-g Single-cell WGA (Qiagen)

Η πρώτη προσπάθεια ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος έγινε με τη χρήση του REPLI-g Single Cell WGA Kit (Qiagen), το οποίο βασίζεται στην ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλών μεταθέσεων (MDA) με τη χρήση τυχαίων εκκινητών. Η δοκιμή της μεθοδολογίας πραγματοποιήθηκε σε δέκα μεμονωμένα κύτταρα, εκ των οποίων τρία είχαν καλλιεργηθεί παρουσία θειαμίνης (+T) και πραγματοποιούσαν φυσιολογική αντιγραφή του DNA και επτά κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί απουσία θειαμίνης (-T) και πραγματοποιούσαν επαναντιγραφή του DNA. Η ισοθερμική ενίσχυση πραγματοποιήθηκε για 8 ώρες και η επιτυχία της διαδικασίας πιστοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την ενίσχυση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Η ενίσχυση του γονιδιώματος των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του REPLI-g Single Cell WGA Kit (Qiagen). Η ισοθερμική ενίσχυση έγινε για 8 ώρες στους 30°C. Ως αρνητικό δείγμα (negative control) της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο δεν περιείχε καθόλου κύτταρα.

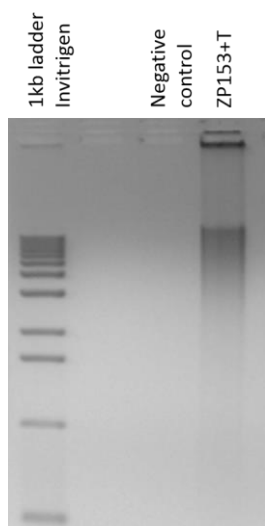


Εικόνα 4.9 Αλληλούχιση χρωμοσώματος I του *S.pombe*. Αριστερά παρουσιάζεται ο αριθμός των *reads* κατά μήκος του χρωμοσώματος I για τα τρία δείγματα ελέγχου. Δεξιά παρουσιάζεται η κατανομή του αριθμού των *reads* για τα δείγματα αυτά.

Στην εικόνα 4.9 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αλληλούχισης του χρωμοσώματος I για τα τρία δείγματα ελέγχου (ZP153+T). Τα διαγράμματα αριστερά παρουσιάζουν τον αριθμό διαβασμάτων (*reads*) κατά μήκος του χρωμοσώματος I των δειγμάτων αυτών, ενώ τα διαγράμματα δεξιά δείχνουν την κατανομή του αριθμού των *reads*. Δεδομένου ότι τα δείγματα ελέγχου είναι κύτταρα που πραγματοποιούν φυσιολογικά την αντιγραφή του DNA τους, μετά την αλληλούχιση θα αναμέναμε ομοιόμορφη κατανομή των *reads* κατά μήκος του γονιδιώματος. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μεγάλη

ετερογένεια ανά περιοχή, με ορισμένες θέσεις του γονιδιώματος να συγκεντρώνουν μεγάλο αριθμό reads ενώ η πλειοψηφία των περιοχών του γονιδιώματος δεν έχει διαβαστεί ικανοποιητικά. Αντίστοιχη ήταν η εικόνα και για τα χρωμοσώματα II και III.

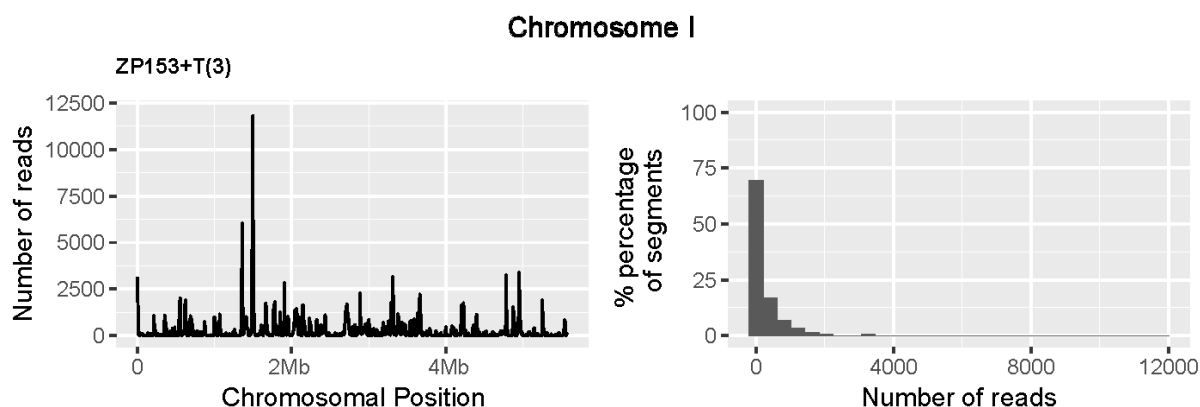
Προκειμένου να μειώσουμε την εμφάνιση ετερογένειας κατά την ενίσχυση του γονιδιώματος, έγινε επανάληψη του πειράματος μειώνοντας στο ελάχιστο ο χρόνος επώασης με την πολυμεράση (από 8 ώρες σε 3). Για τη δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκαν και πάλι δέκα μεμονωμένα κύτταρα, εκ των οποίων τρία είχαν καλλιεργηθεί παρουσία θειαμίνης (+T) και πραγματοποιούσαν φυσιολογική αντιγραφή του DNA και επτά κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί απουσία θειαμίνης (-T).



Εικόνα 4.10 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την ενίσχυση με το REPLI-g Single-cell WGA σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Η ενίσχυση του γονιδιώματος των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του REPLI-g Single Cell WGA Kit (Qiagen). Η ισοθερμική ενίσχυση έγινε για 3 ώρες στους 30°C. Ως αρνητικό δείγμα (negative control) της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο δεν περιείχε καθόλου κύτταρα.

Από τα δέκα δείγματα μόνο στο ένα (ZP153+T(3)) έγινε επιτυχώς η ενίσχυση και ακολούθησε αλληλούχηση πλήρους γονιδιώματος (εικόνα 4.10). Το αποτέλεσμα της αλληλούχησης παρουσιάζεται στην εικόνα 4.11. Παρατηρείται ότι η κάλυψη του χρωμοσώματος είναι καλύτερη σε σύγκριση με την προηγούμενη προσπάθεια (περισσότερες περιοχές καλύπτονται από περισσότερα reads), ωστόσο βλέπουμε ότι

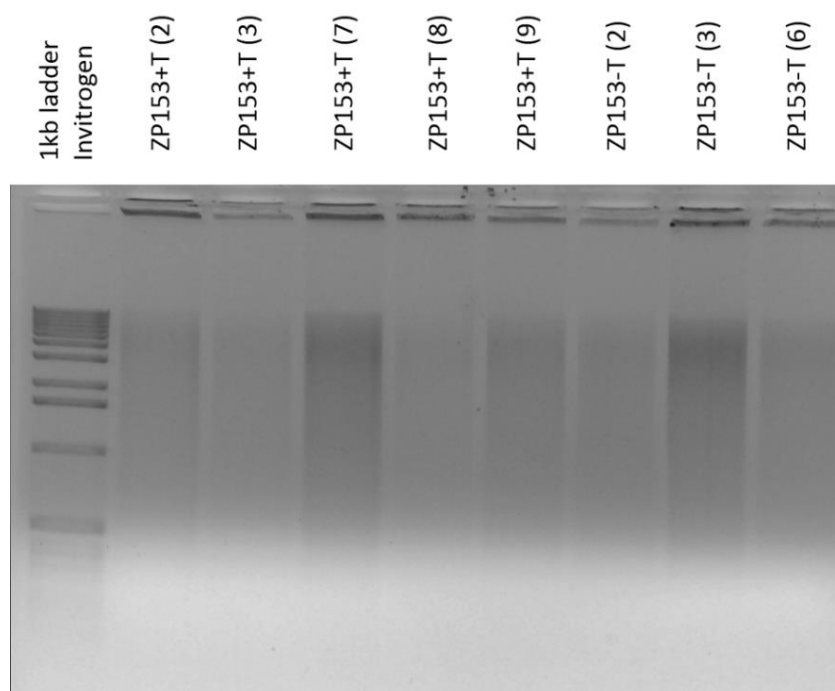
το πρόβλημα της ετερογένειας ως προς τον αριθμό αντιγράφων κατά μήκος του γονιδιώματος παραμένει.



Εικόνα 4.11 Αλληλούχιση χρωμοσώματος I του *S.pombe* μετά από ενίσχυση γονιδιώματος με το REPLI-g Single-cell WGA (Qiagen). Αριστερά παρουσιάζεται ο αριθμός των reads κατά μήκος του χρωμοσώματος I για τα τρία δείγματα ελέγχου. Δεξιά παρουσιάζεται η κατανομή του αριθμού των reads για τα δείγματα αυτά.

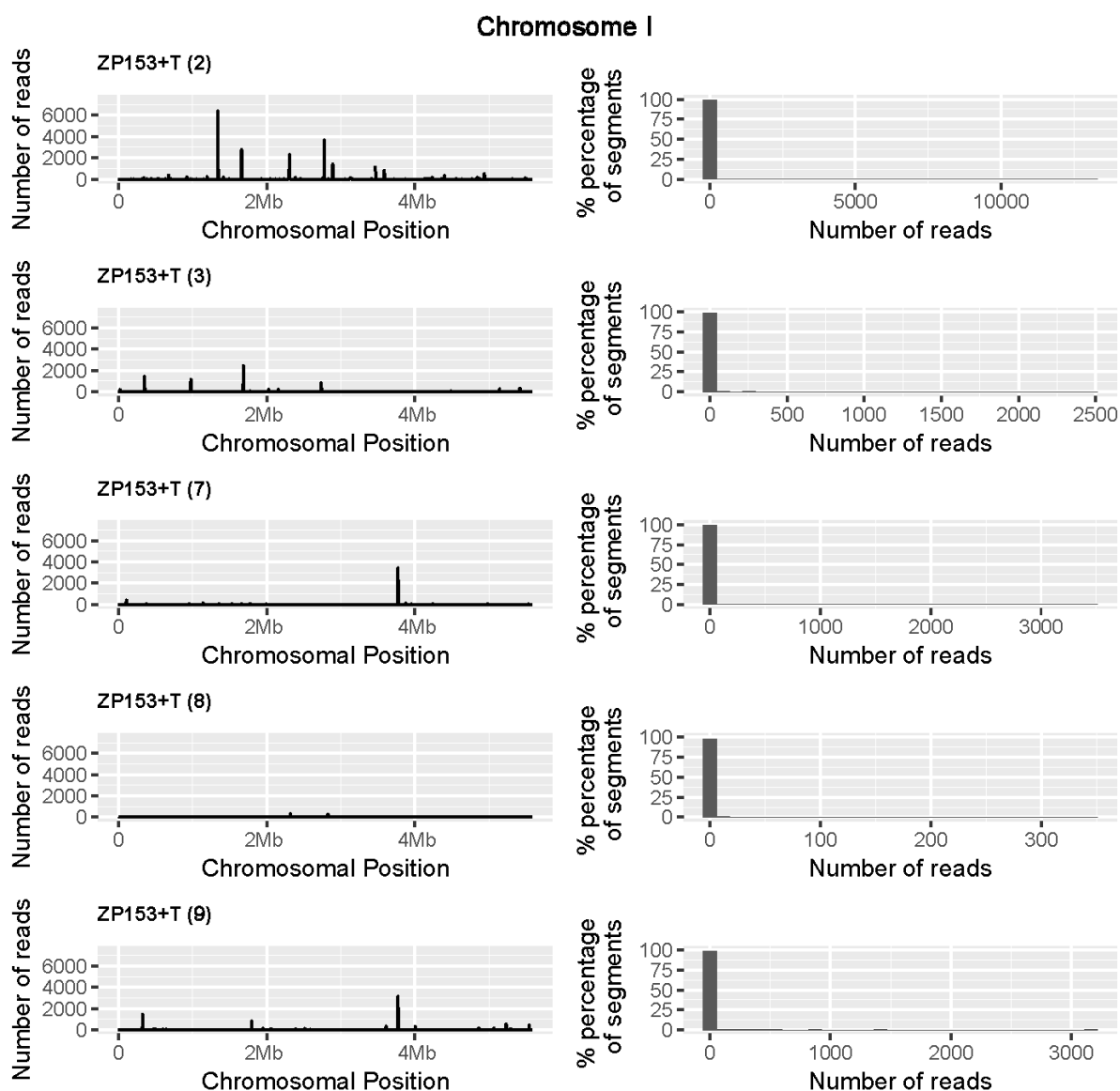
TruePrime Single-cell WGA (SYGNIS)

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το TruePrime Single-Cell WGA της SYGNIS. Βασίζεται και αυτό στη μέθοδο MDA ωστόσο αντί για τυχαίους εκκινητές χρησιμοποιεί μια πριμάρση για τη σύνθεση εκκινητών. Αυτή η διαδικασία θεωρητικά μειώνει το sequence bias που μπορεί να προκαλείται κατά την υβριδοποίηση των τυχαίων εκκινητών και κατ' επέκταση οδηγεί σε πιο ομοιόμορφη ενίσχυση του γονιδιώματος. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν ένα θετικό δείγμα ελέγχου (100 κύτταρα) και ένα αρνητικό δείγμα (χωρίς κύτταρα), 10 δείγματα με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία θειαμίνης, και 15 δείγματα απουσία θειαμίνης.



Εικόνα 4.12 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την ενίσχυση με το *TruePrime Single-cell WGA* σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Η ισοθερμική ενίσχυση έγινε για 3 ώρες στους 30°C. Ως αρνητικό δείγμα (*negative control*) της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο δεν περιείχε καθόλου κύτταρα.

Από τα 25 δείγματα συνολικά, στα 11 έγινε επιτυχώς η ενίσχυση και ακολούθησε αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος. Στην εικόνα 4.12 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα πρότυπα ορισμένων δειγμάτων από αυτά, έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%).

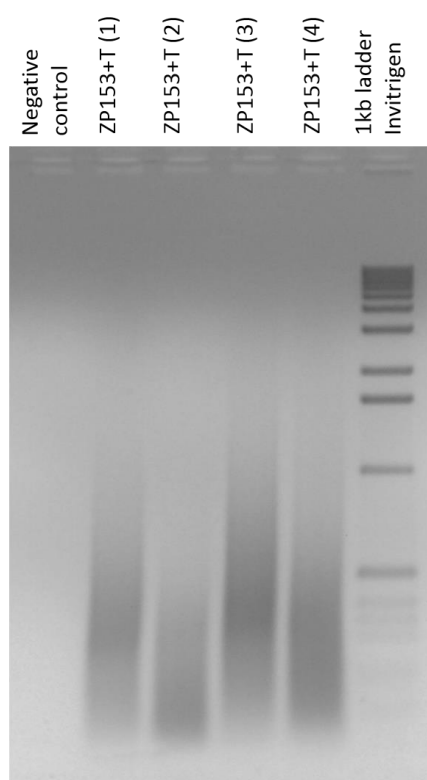


Εικόνα 4.13 Αλληλούχιση χρωμοσώματος I του *S.pombe*. Αριστερά παρουσιάζεται ο αριθμός των reads κατά μήκος του χρωμοσώματος I για τα τρία δείγματα ελέγχου. Δεξιά παρουσιάζεται η κατανομή του αριθμού των reads για τα δείγματα αυτά.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης έδειξε ότι δεν υπάρχει καλή κάλυψη του γονιδιώματος αφού η πλειοψηφία των περιοχών αντιπροσωπεύεται από ελάχιστα έως καθόλου reads, ενώ παράλληλα ανιχνεύτηκαν πολλά reads τα οποία προέρχονταν από ανθρώπινο γονιδίωμα και όχι από *S.pombe*. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπήρξε μόλυνση των δειγμάτων είτε κατά τη διαδικασία του sorting ή της ενίσχυσης του γονιδιώματος.

GenomePlex WGA (Sigma-Aldrich)

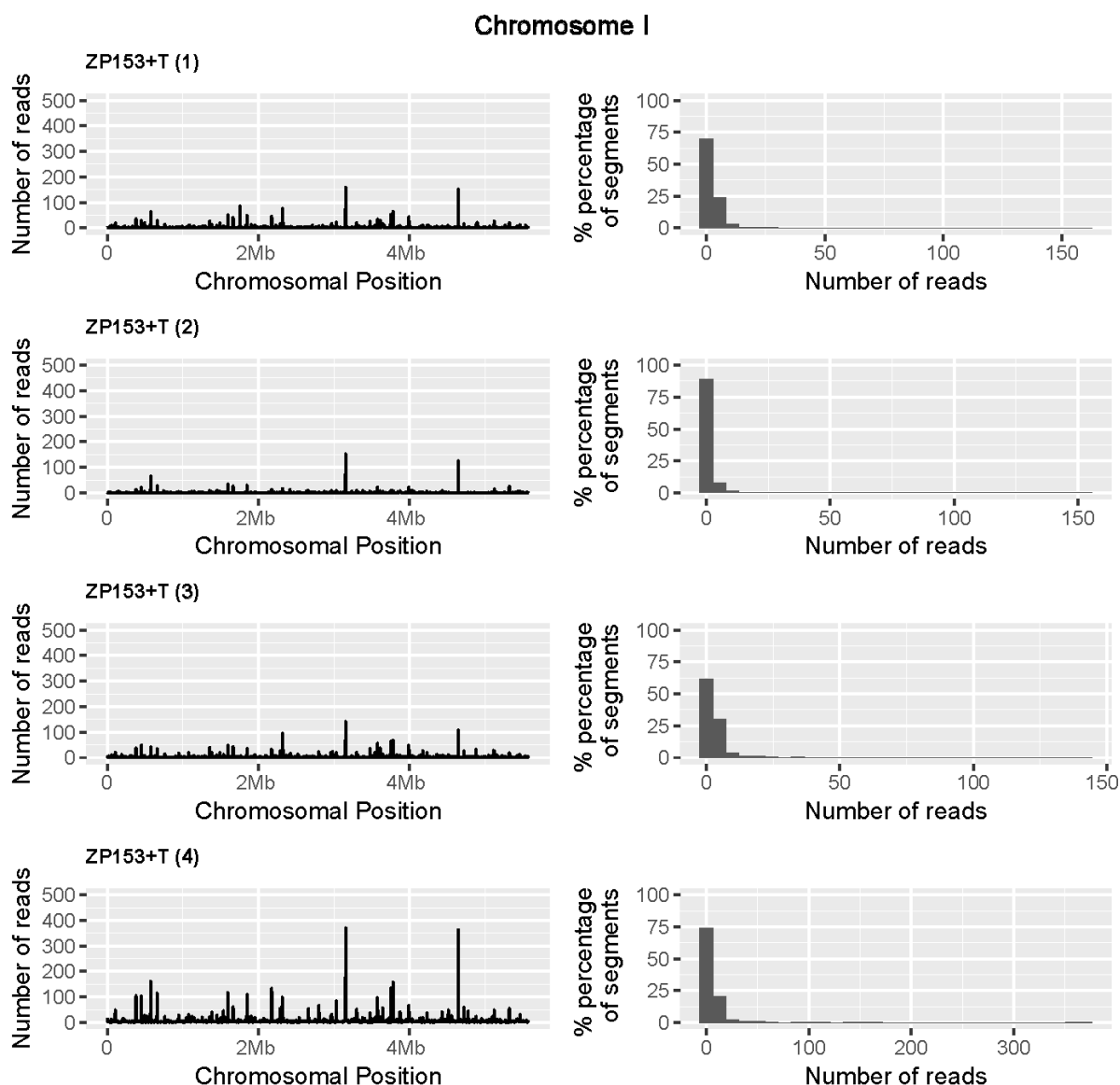
Τέλος χρησιμοποιήθηκε το GenomPlex WGA της Sigma-Aldrich το οποίο βασίζεται στην θραυσματοποίηση του γονιδιώματος και την ενίσχυση με PCR. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε 4 δείγματα κυττάρων που καλλιιεργήθηκαν παρουσία θειαμίνης (+T), 4 απουσία θειαμίνης (-T) καθώς και σε ένα δείγμα θετικού ελέγχου (100 κύτταρα) και ένα αρνητικού ελέγχου (χωρίς κύτταρα). Στην εικόνα 4.14 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα προϊόντα ενίσχυσης για τα δείγματα +T έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%).



Εικόνα 4.14 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την ενίσχυση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Η ενίσχυση του γονιδιώματος των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του GenomPlex WGA (Sigma-Aldrich). Ως αρνητικό δείγμα (negative control) της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο δεν περιείχε καθόλου κύτταρα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έδειξε ότι παρά την επιτυχή ενίσχυση των δειγμάτων, δεν υπάρχει ικανοποιητική κάλυψη του γονιδιώματος εφόσον οι περισσότερες περιοχές αντιπροσωπεύονται από ελάχιστα reads (εικόνα

4.15). Επιπλέον και σε αυτή την περίπτωση ανιχνεύτηκαν πολλά reads προερχόμενα από ανθρώπινο γονιδίωμα και όχι από *S.pombe* γεγονός που δείχνει ύπαρξη μόλυνσης πιθανότατα κατά τη διαδικασία του sorting.



Εικόνα 4.15 Αλληλούχιση χρωμοσώματος I του *S.pombe* έπειτα από ενίσχυση γονιδιώματος με το GenomePlex WGA. Αριστερά παρουσιάζεται ο αριθμός των reads κατά μήκος του χρωμοσώματος I για τα τρία δείγματα ελέγχου. Δεξιά παρουσιάζεται η κατανομή του αριθμού των reads για τα δείγματα αυτά.

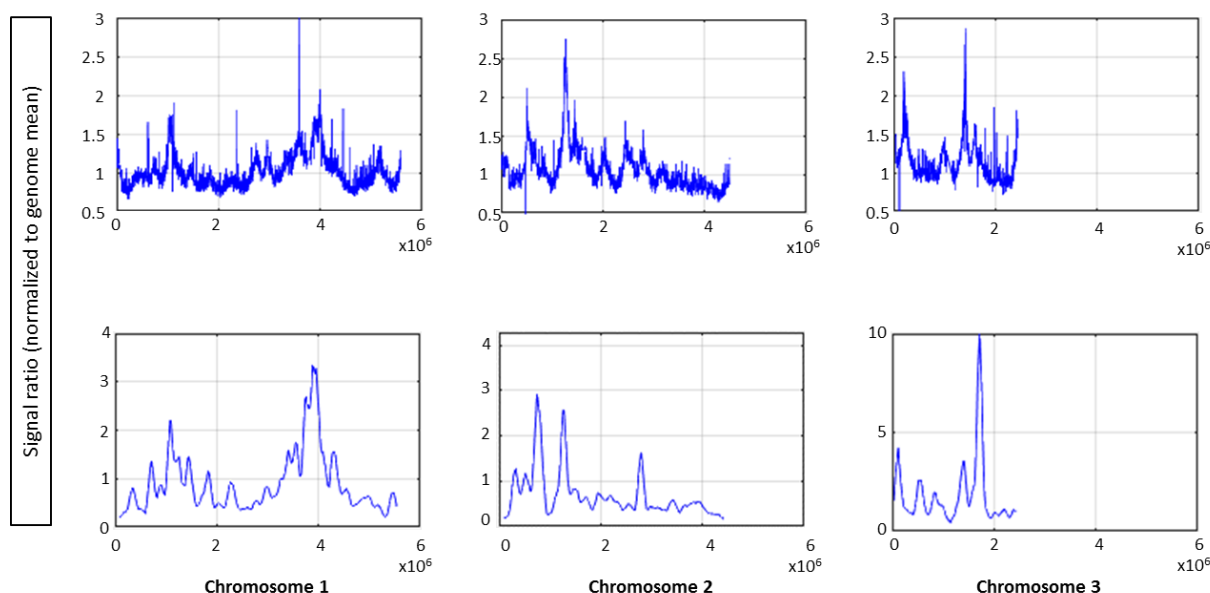
Παρατηρούμε λοιπόν πως το κυριότερο εμπόδιο για την αλληλούχιση γονιδιωμάτων από μεμονωμένα κύτταρα αποτελεί η ύπαρξη μόλυνσεων. Η μόλυνση των δειγμάτων

μπορεί να προκύψει είτε στο στάδιο της καλλιέργειας των κυττάρων είτε κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού τους στον κυτταροδιαχωριστή. Στην πρώτη περίπτωση το πρόβλημα μπορεί να περιοριστεί με τη προσεκτική διαχείριση των δειγμάτων. Ωστόσο, αν η μόλυνση των καλλιεργειών συμβαίνει κατά τη χρήση του κυτταροδιαχωριστή, τότε θα πρέπει να ακολουθηθεί διαφορετική προσέγγιση για τον διαχωρισμό μεμονωμένων κυττάρων. Εναλλακτικά λοιπόν, ο διαχωρισμός των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαδοχικών αραιώσεων των καλλιεργειών, είτε με τη χρήση ειδικών συσκευών μικρορευστομηχανικής (microfluidics). Ένα επιπλέον πρόβλημα που παρατηρήθηκε (συγκεκριμένα κατά τη χρήση του REPLI-g Single-cell WGA) είναι η έλλειψη ομοιομορφίας στην ενίσχυση των γονιδιωμάτων. Έτσι λοιπόν εμφανίζονται περιοχές οι οποίες τείνουν να ενισχύονται περισσότερο καθιστώντας αδύνατη την ανάλυση του αριθμού αντιγράφων του γονιδιώματος. Η μέθοδος της ισοθερμικής ενίσχυσης πολλαπλών εκτοπίσεων (MDA) αλλά και οι μέθοδοι ενίσχυσης που βασίζονται στην PCR μπορούν να επιτρέψουν την μεροληπτικότητα κατά την ενίσχυση του γονιδιώματος. Η μεθοδολογία MALBAC (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles) αποτελεί μια πολύ καλή εναλλακτική μέθοδο ενίσχυσης του γονιδιώματος, η οποία μειώνει το σφάλμα που εξαρτάται από την αλληλουχία και το οποίο επιδεινώνεται από την εκθετική ενίσχυση. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθοδολογίας σε συνδυασμό με έναν πιο αποδοτικό τρόπο για το διαχωρισμό των κυττάρων ενδεχομένως να συνέβαλε αρκετά στην ομοιόμορφη ενίσχυση του γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων *S.pombe* επιτρέποντας την αλληλούχισή τους και τη βαθύτερη μελέτη του φαινομένου της επαναντιγραφής.

4.1.3 Διερεύνηση της ρύθμισης της επαναντιγραφής των τελομερών

Η χρήση του μοντέλου της επαναντιγραφής με δεδομένα προερχόμενα από τον *S.pombe* επιτρέπει και τη μελέτη του φαινομένου σε επίπεδο πληθυσμού κυττάρων. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 100 προσομοιώσεις του μοντέλου για τον υπολογισμό του μέσου όρου αντιγράφων κάθε γενετικού τόπου σε επίπεδο πληθυσμού (διδακτορική διατριβή Μαριάννας Ραφομανίκη). Η ανάλυση αυτή υποδεικνύει ότι τα επίπεδα επαναντιγραφής σύμφωνα με τις προσομοιώσεις δεν είναι ομοιόμορφα κατά μήκος του γονιδιώματος, αλλά εμφανίζονται συγκεκριμένες περιοχές επιρρεπείς σε αυξημένη επαναντιγραφή, ενώ υπάρχουν επίσης περιοχές που τείνουν να υπο-αντιγράφονται. Στη συνέχεια της ίδιας

μελέτης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προφίλ που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις, με διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα τα οποία δημοσιεύτηκαν στη μελέτη [93]. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση πραγματοποιήθηκε πρόκληση επαναντιγραφής σε κύτταρα *S.pombe* με την υπερέκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdc18 και Cdt1, ενώ ακολούθησε ποσοτικοποίηση των επιπέδων επαναντιγραφής όλων των περιοχών του γονιδιώματος με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες (Comparative Genomic Hybridization, CGH).



Εικόνα 4.16 Αναπαράσταση πειραματικών δεδομένων (πάνω) και δεδομένων προσομοίωσης (κάτω) και για τα τρία χρωμοσώματα του *S.pombe*. Σε επίπεδο πληθυσμού οι προσομοιώσεις αναπαράγουν ικανοποιητικά το προφίλ των πειραματικών δεδομένων.

Η σύγκριση των πειραματικών και προσομοιωμένων προφίλ επαναντιγραφής, έδειξε ότι το μοντέλο αναπαράγει σε ικανοποιητικό βαθμό τα πειραματικά δεδομένα. Ορισμένες διαφοροποιήσεις εντοπίστηκαν σε μεμονωμένες περιοχές αλλά και στην περιοχή κοντά στα τελομερή (υποτελομερικές περιοχές). Συγκεκριμένα ο αριθμός αντιγράφων των υποτελομερών σύμφωνα με το μοντέλο προβλέπεται να είναι χαμηλός, αποτέλεσμα που συνάδει με την χαμηλή αποδοτικότητα των θέσεων έναρξης που βρίσκονται στην περιοχή. Ωστόσο όμως, στα πειραματικά δεδομένα, τα επίπεδα επαναντιγραφής των υποτελομερών παρουσιάζονται αυξημένα οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχει επιπλέον μηχανισμός που ρυθμίζει την έναρξη της αντιγραφής στην περιοχή αυτή. Η ύπαρξη μιας πρωτεΐνης που δρα ως περιοριστικός παράγοντας και καταστέλλει την έναρξη της αντιγραφής στην περιοχή των τελομερών θα μπορούσε να εξηγήσει την απόκλιση αυτή. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση εργασίας, κατά τη φυσιολογική αντιγραφή του DNA ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει την

έναρξη της αντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών καταστέλλοντας την πυροδότηση των παρακείμενων αφετηριών. Κατά την επαναντιγραφή καθώς τα αντίγραφα του γονιδιώματος αυξάνονται, τα επίπεδα του κατασταλτικού αυτού παράγοντα δεν επαρκούν ώστε να ρυθμίσουν αρνητικά την πυροδότηση των θέσεων έναρξης με αποτέλεσμα την υπέρ-αντιγραφή των τελομερών.

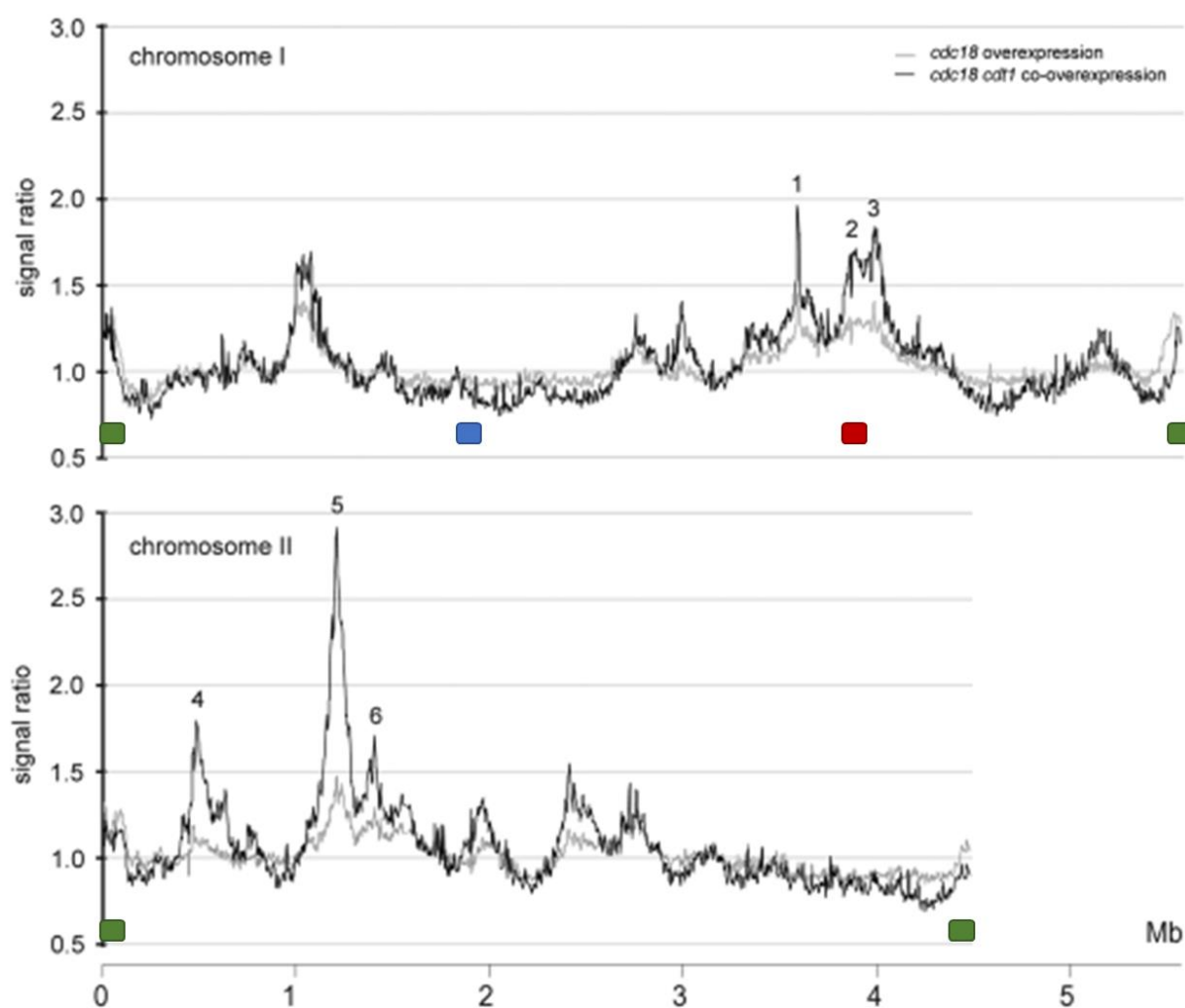
Στον *S. cerevisiae*, η πυροδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής που βρίσκονται κοντά στην περιοχή των τελομερών καθορίζεται από την πρόσδεση του *Rif1* σε ειδικές αλληλουχίες που βρίσκονται κοντά σε αυτές [50]. Το *Rif1* στη συνέχεια στρατολογεί την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) στην περιοχή, η οποία αναιρεί την φωσφορυλίωση των MCM ελικάσων, που πραγματοποιείται φυσιολογικά από την DDK, στις παρακείμενες θέσεις έναρξης καθιστώντας τες μη ενεργές [52-54]. Το *Rif1* αποτελεί υπόστρωμα φωσφορυλίωσης για τις κινάσες ATM/ATR. Έχειδειχθεί ότι η κινάση Tel1 (ομόλογη του ATM) παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μήκους των τελομερών. Συγκεκριμένα προσδένεται σε τελομερή με μικρό μήκος και όπου φωσφορυλιώνει το *Rif1*, ενώ παράλληλα προάγει την πυροδότηση των παρακείμενων θέσεων έναρξης επηρεάζοντας την πρόσδεση του παράγοντα Cdc45 κατά τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου [185, 186]. Στον σχιζοσακχαρομύκητα *S.pombe*, η ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής στις υποτελομερικές περιοχές ρυθμίζεται από τους παράγοντες *Taz1* και *Rif1*. Ο *Taz1* προσδένεται κοντά στις θέσεις έναρξης μέσω ειδικών αλληλουχιών και δρα κατασταλτικά εμποδίζοντας την στρατολόγηση παραγόντων έναρξης όπως το *Sld3* [51]. Ο παράγοντας *Rif1* προσδένεται στην περιοχή των τελομερών μέσω του *Taz1* και δρα επίσης καταστέλλοντας την πυροδότηση των κοντινών θέσεων έναρξης.

Σύμφωνα με αυτές τις πληροφορίες, το *Taz1* ή/και το *Rif1* θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφια μόρια για το ρόλο του περιοριστικού παράγοντα κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής.

4.1.3.1 Σχετική ποσοτικοποίηση των υποτελομερικών περιοχών με real-time qPCR

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο σχετικός αριθμός αντιγράφων DNA στην περιοχή των τελομερών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της real-time qPCR. Επειδή η περιοχή των τελομερών αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι εκκινήτες που

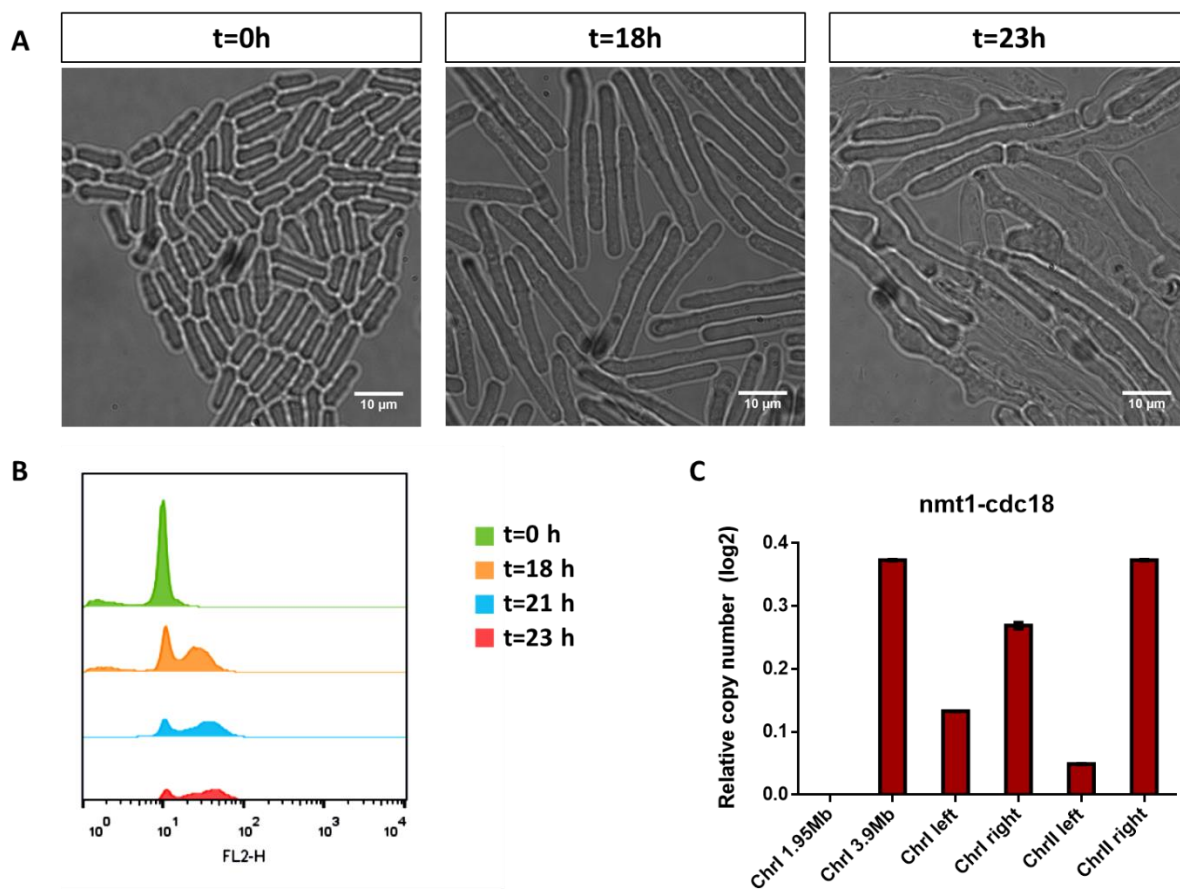
σχεδιάστηκαν είναι ειδικοί για τις περιοχές που προηγούνται των τελομερών (subtelomeric) (Πίνακας 3.16). Ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η περιοχή του ChrI 1.95Mb η οποία όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.17 επαναντιγράφεται στα ίδια επίπεδα με το μέσο όρο του γονιδιώματος ενώ ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η περιοχή ChrI 3.9Mb η οποία παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα επαναντιγραφής.



Εικόνα 4.17 Αναπαράσταση των περιοχών του χρωμοσώματος I που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση επιπέδων επαναντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών. Το σημείο ChrI 1.95 Mb (μπλε) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς, ενώ η περιοχή ChrI 3.9 Mb (κόκκινο) ως σημείο θετικού ελέγχου. Με πράσινο χρώμα αναπαρίστανται οι υποτελομερικές περιοχές των χρωμοσωμάτων I και II των οποίων τα επίπεδα επαναντιγραφής προσδιορίστηκαν με real-time qPCR [93]. Η κανονικοποίηση των επιπέδων επαναντιγραφής των υπόλοιπων περιοχών που διερευνήθηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο REST-MCS.

Η επαγωγή της επαναντιγραφής έγινε στο στέλεχος ZP153 το οποίο φέρει το γονίδιο *cdc18+* κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή *nmt1*. Η υπερέκφραση του

cdc18+ έγινε με αφαίρεση θειαμίνης από το θρεπτικό μέσο και καλλιέργεια των κυττάρων για 23 ώρες, ενώ ενδιάμεσα στις 18 και 21 ώρες έγινε λήψη δείγματος καλλιέργειας για ανάλυση του περιεχόμενου DNA τους με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.18 A ήδη από τις 18 ώρες μετά την απομάκρυνση της θειαμίνης αλλάζει η μορφολογία των κυττάρων τα οποία αποκτούν χαρακτηριστικό επίμηκες σχήμα. Στις 23 ώρες επαγωγής τα επιμηκυμένα κύτταρα αποκτούν περαιτέρω αλλοιώσεις όπως διακλαδώσεις και σε ορισμένες περιπτώσεις διογκωμένους πυρήνες. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι το συνολικό DNA των κυττάρων στις 18 ώρες είναι αυξημένο και συνεχίζει να αυξάνεται, επιβεβαιώνοντας ότι τα κύτταρα πραγματοποιούν επαναντιγραφή (εικόνα 4.18 B). Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των τελομερών, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία θειαμίνης για 23 ώρες. Το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την αντίδραση της real-time qPCR. Στην εικόνα 4.18 C βλέπουμε την ποσοτικοποίηση των 4 υποτελομερικών περιοχών των χρωμοσωμάτων I και II. Τα αποτελέσματα της qPCR επιβεβαιώνουν ότι οι περιοχές αυτές πραγματοποιούν αυξημένη επαναντιγραφή και παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων σε σχέση με το μέσο όρο του γονιδιώματος.



Εικόνα 4.18 Επανάτιγγραφή γονιδιώματος και τελομερικών περιοχών. Η υπερέκφραση του γονιδίου *cdc18+* από τον έλεγχο του υποκινητή *nmt1* επάγει επανάτιγγραφή του DNA των κυττάρων μετά από 18 ώρες καλλιέργειας απουσία θειαμίνης. **(Α)** Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων κατά την επαγωγή της υπερέκφρασης του γονιδίου *cdc18+*. **(Β)** Ανάλυση του περιεχόμενου DNA με κυτταρομετρία ροής. **(C)** Ποσοτικοποίηση του σχετικού αριθμού αντιγράφων DNA των υποτελομερικών περιοχών των χρωμοσωμάτων I και II με *real-time qPCR*. Οι περιοχές των τελομερών παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα επανάτιγγραφής σε σχέση με την περιοχή *ChrII 1.95Mb*, τα επίπεδα του οποίου αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο του γονιδιώματος.

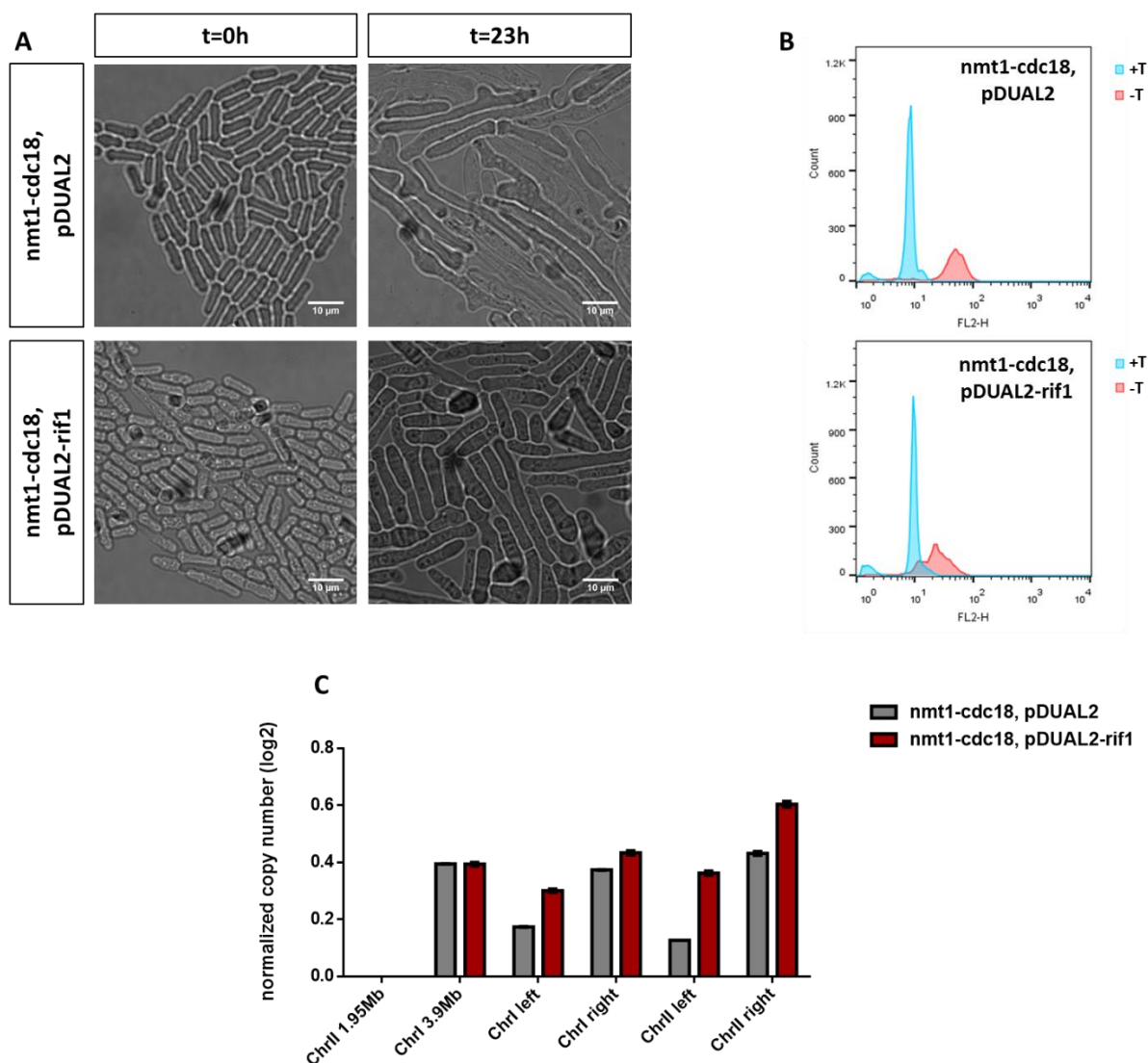
4.1.3.2 Διερεύνηση πιθανού ρόλου των πρωτεϊνών *Rif1* και *Taz1*

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι διαφορές στον αριθμό αντιγράφων των τελομερών μεταξύ των πειραματικών και *in silico* δεδομένων, θα μπορούσαν να εξηγηθούν με την ύπαρξη ενός περιοριστικού παράγοντα που δρα καταστέλλοντας στις γειτονικές αφετηρίες. Ενώ λοιπόν κατά τη φυσιολογική αντιγραφή ο παράγοντας

αυτός παρεμποδίζει την πυροδότηση των αφετηριών που βρίσκονται στις υποτελομερικές περιοχές, κατά την επαναντιγραφή, που τα αντίγραφα του γονιδιώματος αυξάνονται, τα επίπεδα του κατασταλτικού αυτού παράγοντα ενδεχομένως να μην επαρκούν για την καταστολή της πυροδότησης των θέσεων έναρξης με αποτέλεσμα την υπέρ-αντιγραφή των περιοχών αυτών. Προκειμένου να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο των *Rif1* και *Taz1* στην επαναντιγραφή των τελομερικών περιοχών, οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράστηκαν σε συνδυασμό με το *cdc18*, ενώ ακολούθησε ποσοτικοποίηση των τελομερικών περιοχών με real-time qPCR.

Rif1

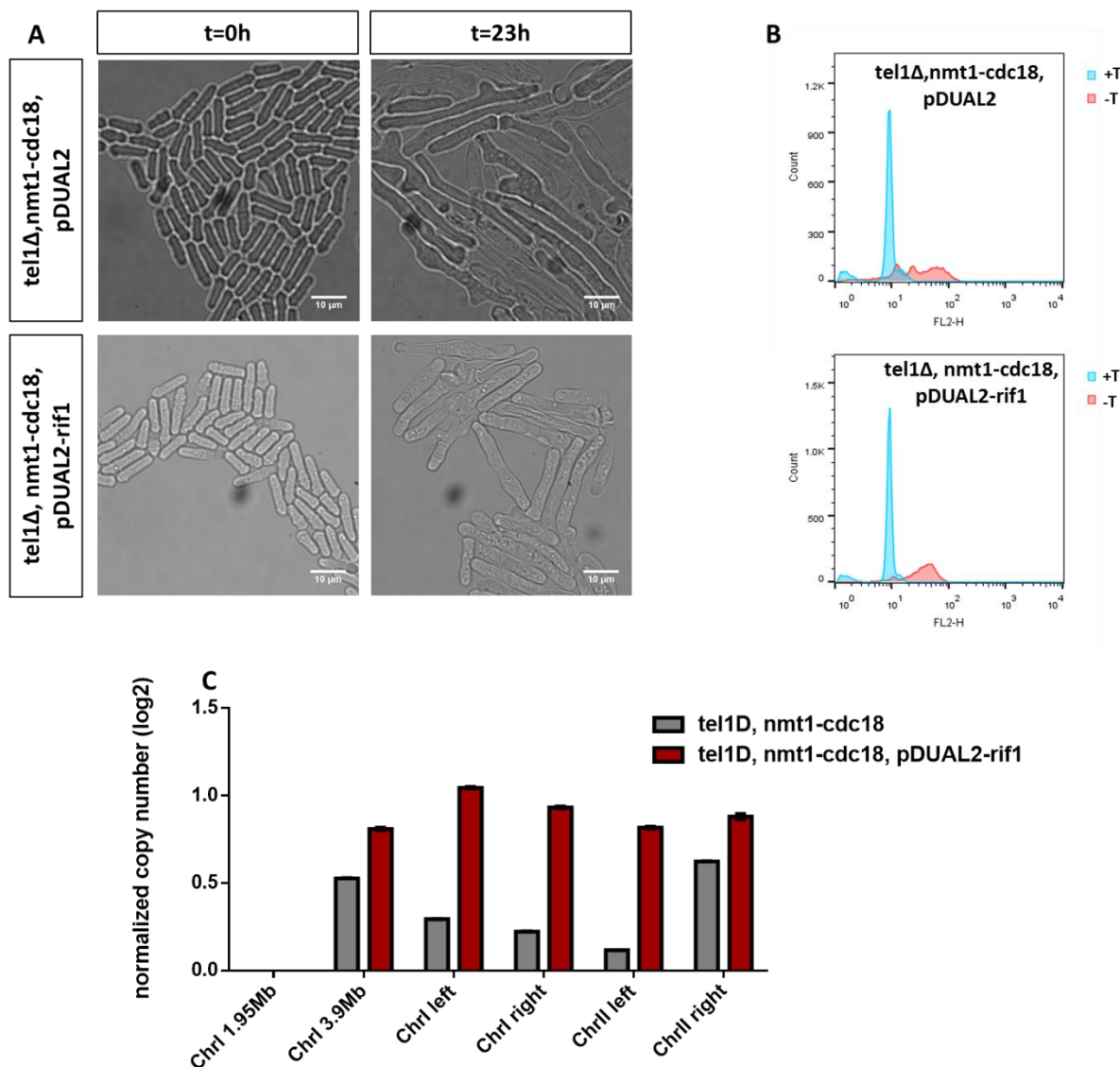
Για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου του *Rif1* στη ρύθμιση των τελομερικών περιοχών κατά την επαναντιγραφή κατασκευάστηκε ένα στέλεχος (ZP326) το οποίο υπερέκφραζε ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες *Cdc18* και *Rif1*. Αρχικά κατασκευάστηκε πλασμίδιο με βάση το φορέα κλωνοποίησης pDUAL2-GFH1c που φέρει τον επαγόμενο υποκινητή *hmt1* και ένθεμα το γονίδιο *rif1+* σηματομενόμενο με την φθορίζουσα χρωστική GFP. Κύτταρα του στελέχους ZP153 στη συνέχεια, μετασχηματίστηκαν είτε με το πλασμίδιο αυτό, είτε με τον άδειο φορέα κλωνοποίησης pDUAL2-GFH1c προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως δείγμα ελέγχου. Η επαγωγή της υπερέκφρασης του *Rif1* καθώς και του *Cdc18* έγινε με καλλιέργεια των κυττάρων απουσία θειαμίνης για 23 ώρες, ενώ αρχικά έγινε ανάλυση των συνολικών επιπέδων DNA με κυτταρομετρία ροής προκειμένου να εξακριβώσουμε αν η επαναντιγραφή διεξάγεται κανονικά κατά την υπερεκφράση του *Rif1*. Στην εικόνα 4.19 B φαίνεται η αύξηση του συνολικού DNA των κυττάρων ελέγχου που φέρουν τον άδειο φορέα pDUAL2 και των κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο pDUAL-rif1 (στέλεχος ZP326). Με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής παρατηρούμε ότι κατά την υπερέκφραση του *Rif1* η επαναντιγραφή δεν προχωράει το ίδιο αποτελεσματικά ενώ η μικροσκοπική παρατήρηση (εικόνα 4.19 A), έδειξε ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν *Rif1*, κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής δεν αποκτούν απαραίτητα το χαρακτηριστικό επίμηκες σχήμα τους, αλλά εμφανίζονται στρογγυλά με διογκωμένους πυρήνες. Η ποσοτικοποίηση των υποτελομερικών περιοχών στα κύτταρα αυτά με real-time qPCR έδειξε ότι η υπερέκφραση του παράγοντα *Rif1* οδηγεί σε αύξηση του αριθμού αντιγράφων σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (εικόνα 4.19 C).



Εικόνα 4.19 Υπερέκφραση του παράγοντα Ri1+ κατά την επαναντιγραφή κυττάρων *S.pombe*. **A)** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων των στελεχών ZP153 και ZP326 πριν την επαγωγή (αριστερά) και μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης των *cdc18* και *rif1* για 23 ώρες (Scale bar: 10μm) **B)** Μέτρηση περιεχόμενου DNA σε κύτταρα που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (πάνω) και ταυτόχρονη υπερέκφραση του γονιδίου *rif1+* για 23 ώρες (κάτω). **C)** Ποσοτικοποίηση υποτελομερικών περιοχών κυττάρων που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (γκρι) και ταυτόχρονη υπερέκφραση *ri1+* για 23 ώρες (κόκκινο).

Δεδομένης της εμπλοκής της *Tel1* στη χρονική ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών, αλλά και του ρόλου του στην φωσφορυλίωση του *Rif1*, θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση που έχει η υπερέκφραση του *rif1+* σε κύτταρα *S.pombe* που έγινε απαλοιφή του *tel1* γονιδίου. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε το στέλεχος ZP360 το οποίο φέρει το *cdc18+* υπό τον έλεγχο του *nmt1* καθώς και απαλοιφή του *tel1* γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός

του στελέχους αυτού είτε με το πλασμίδιο *pDUAL2-rif1+*, είτε με τον άδειο φορέα κλωνοποίησης *pDUAL2* (δείγμα ελέγχου). Για την επαγωγή της υπερέκφρασης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία θειαμίνης για 23 ώρες ενώ παράλληλα ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για το ίδιο διάστημα σε θρεπτικό που περιείχε θειαμίνη. Στην εικόνα 4.20 Β φαίνεται η αύξηση του συνολικού DNA των κυττάρων ελέγχου που φέρουν τον άδειο φορέα *pDUAL2* και του στελέχους που φέρει το πλασμίδιο *pDUAL2-rif1+*. Παρατηρήθηκε στα κύτταρα στα οποία απουσιάζει το γονίδιο *tel1+*, η επαναντιγραφή του DNA προχωράει ομαλά ακόμα και κατά την υπερέκφραση του *Rif1*. Μορφολογικά τα κύτταρα μετά από 23 ώρες επαγωγής, αποκτούν χαρακτηριστικό επίμηκες σχήμα που υποδηλώνει επαναντιγραφή, χωρίς τις αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα που φέρουν το αγρίου τύπου αλληλόμορφο της *Tel1* κάτω από συνθήκες υπερέκφρασης του *Rif1* (εικόνα 4.19 Α). Η ποσοτικοποίηση των υποτελομερικών περιοχών στα κύτταρα αυτά με real-time qPCR έδειξε αύξηση του αριθμού αντιγράφων ο οποίος δεν περιορίζεται μόνο στις υποτελομερικές περιοχές αλλά και στην περιοχή *ChrI* 3.9Mb που χρησιμοποιήθηκε ως περιοχή θετικού ελέγχου (εικόνα 4.20 C).



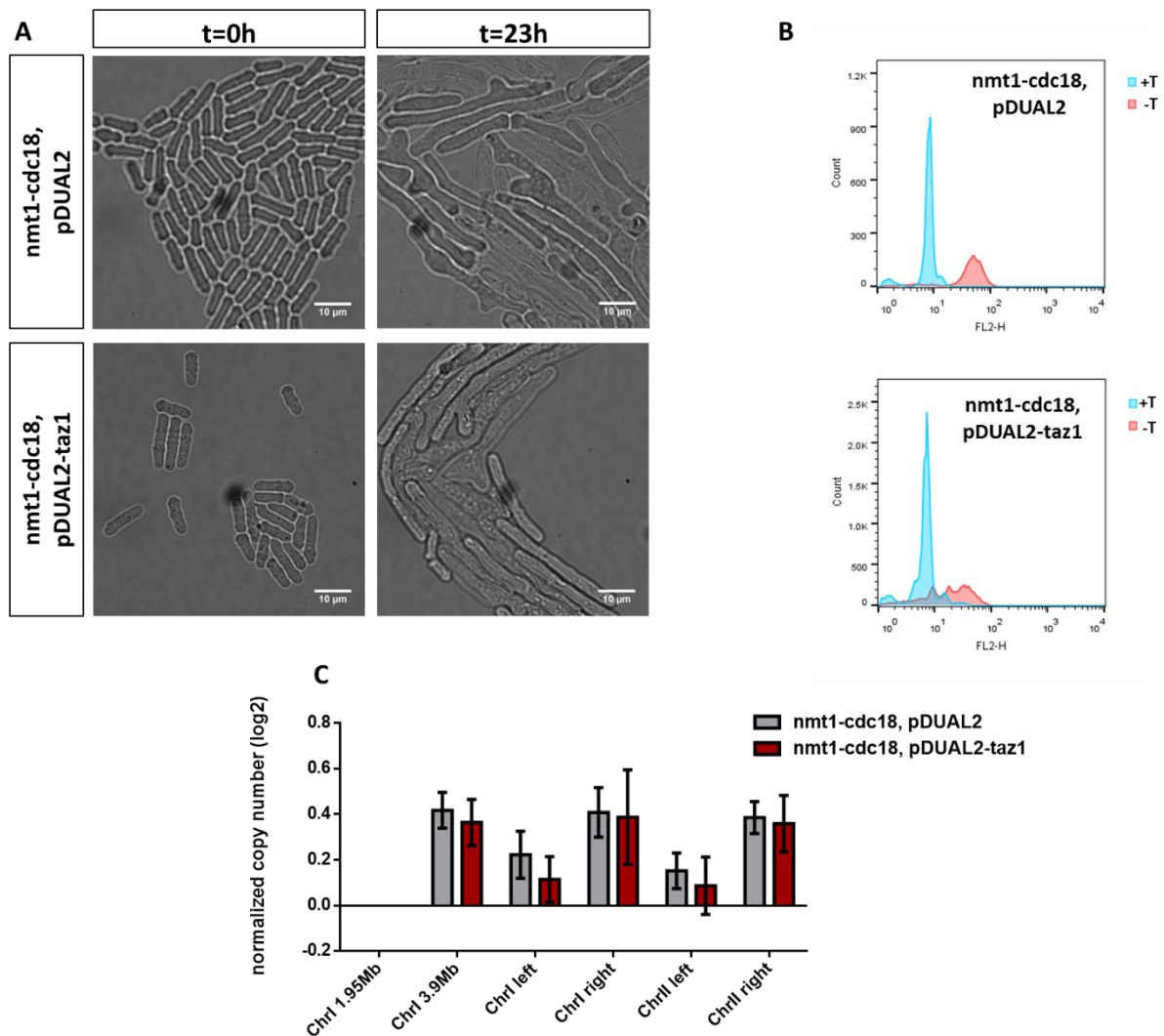
Εικόνα 4.20 Υπερέκφραση του παράγοντα Rif1 κατά την επαναντιγραφή κυττάρων *S.pombe* απουσία της *Tel1*. **A) Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του στελέχους ZP374 πριν την επαγωγή (πάνω) και μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης των *cdc18* και *rif1* για 23 ώρες (Scale bar: 10μm). **B)** Μέτρηση περιεχομένου DNA σε κύτταρα *tel1Δ* που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (αριστερά) και ταυτόχρονη υπερέκφραση του γονιδίου *rif1+* για 23 ώρες. **C)** Ποσοτικοποίηση υποτελομερικών περιοχών κυττάρων *tel1Δ* που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (γκρι) και ταυτόχρονη υπερέκφραση *ri1+* για 23 ώρες (κόκκινο).**

Παρατηρούμε λοιπόν ότι παρουσία αυξημένων επιπέδων του παράγοντα *Rif1* ενισχύεται η επαναντιγραφή των υποτελομερικών περιοχών, ενώ ο φαινότυπος αυτός είναι ακόμα πιο έντονος σε κύτταρα τα οποία φέρουν απαλοιφή του γονιδίου της *Tel1*. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ο *Rif1* δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την καταστολή της πυροδότησης των υποτελομερικών αφετηριών. Αντιθέτως,

φαίνεται πως κατά την επαναντιγραφή του γονιδιώματος ο παράγοντας *Rif1* δρα μέσω κάποιου διαφορετικού μηχανισμού προκειμένου να αυξήσει τα επίπεδα επαναντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών.

Taz1

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο πιθανός ρόλος του *Taz1* στην ρύθμιση της επαναντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών. Όπως και στην περίπτωση του *Rif1*, κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο με βάση το φορέα κλωνοποίησης pDUAL2 που περιλαμβάνει τον υποκινητή *nmt1* και ως ένθεμα το γονίδιο *taz1+*. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό του στελέχους ZP153 για την κατασκευή του στελέχους ZP328, ενώ ως στέλεχος ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το ZP153 μετασχηματισμένο με τον άδειο φορέα pDUAL2. Για την επαγωγή της επαναντιγραφής και της υπερέκφρασης του *Taz1* πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό χωρίς θειαμίνη για 23 ώρες. Κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παράλληλα παρουσία θειαμίνης χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα αρνητικού ελέγχου. Η μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων (εικόνα 4.21 A) έδειξε ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το *Taz1* έχουν παρόμοια μορφολογία με τα κύτταρα που υπόκεινται απλά σε επαναντιγραφή. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής επιβεβαίωσε ότι η επαγωγή της επαναντιγραφής στο στέλεχος που υπερεκφράζει το *Taz1* προχωράει ομαλά και υπάρχει αυξημένο περιεχόμενο DNA στις 23 ώρες μετά την απομάκρυνση θειαμίνης. Η ποσοτικοποίηση των υποτελομερικών περιοχών του στελέχους αυτού με real-time qPCR έδειξε μια μικρή μείωση στον σχετικό αριθμό αντιγράφων σε σύγκριση με το στέλεχος ελέγχου, ωστόσο όμως η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνα 4.21 C).



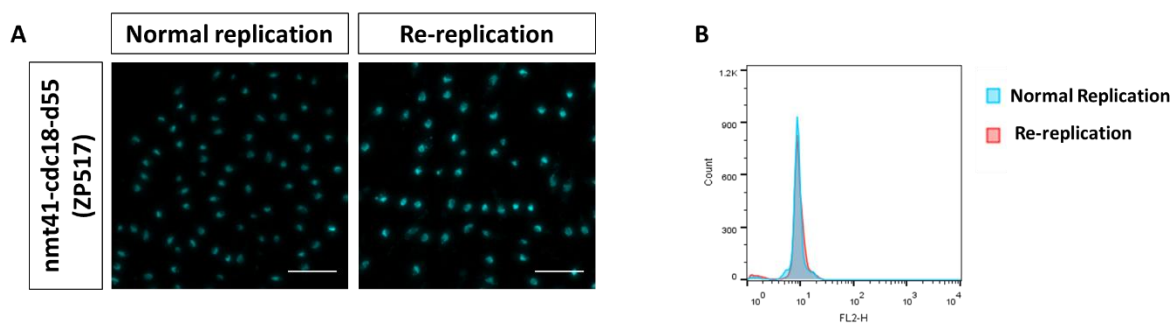
Εικόνα 4.21 Υπερέκφραση του παράγοντα Taz1 κατά την επαναντιγραφή κυττάρων *S.pombe*. A) Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων των στελεχών ZP153 και ZP328 πριν την επαγωγή (αριστερά) και μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης των *cdc18* και *taz1* για 23 ώρες (Scale bar: 10μm). **B)** Μέτρηση περιεχόμενου DNA σε κύτταρα που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (πάνω) και ταυτόχρονη υπερέκφραση του γονιδίου *taz1+* για 23 ώρες (κάτω). **C)** Ποσοτικοποίηση υποτελομερικών περιοχών των κυττάρων που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (γκρι) και ταυτόχρονη υπερέκφραση *taz1+* για 23 ώρες (κόκκινο) ($n=3$).

Παρατηρούμε λοιπόν ότι το *Taz1* πιθανά να έχει ρόλο περιοριστικού παράγοντα κατά την επαναντιγραφή των τελομερών. Η μικρή μείωση που παρατηρείται στα επίπεδα επαναντιγραφής των τελομερικών περιοχών κατά την υπερέκφραση του *Taz1* μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη κάποιου επιπλέον παράγοντα που βρίσκεται επίσης σε περιοριστική συγκέντρωση, για παράδειγμα του *Rif1*. Επομένως η στρατολόγηση του επιπλέον *Taz1* στα τελομερή δεν επιφέρει αυξημένη στρατολόγηση του *Rif1* στις περιοχές αυτές, με αποτέλεσμα να μη γίνεται επαρκώς η καταστολή της πυροδότησης των παρακείμενων αφετηριών.

4.1.4 Διερεύνηση του μηχανισμού πρόκλησης επαναντιγραφής

Τέλος έγινε προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού που φυσιολογικά ρυθμίζει την επαναντιγραφή του DNA στον *S.pombe*. Το στέλεχος ZP152 το οποίο φέρει τη μεταλλαγμένη μορφή *cdc18-d55* από υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nmt41*, αποτελεί ιδανικό γενετικό εργαλείο για το σκοπό αυτό. Η επαγωγή του *nmt* υποκινητή στο στέλεχος αυτό οδηγεί σε υπερέκφραση του *cdc18-d55* σε πολύ χαμηλά επίπεδα, με αποτέλεσμα να μην είναι εμφανής ο φαινότυπος της επαναντιγραφής. Το χαρακτηριστικό αυτό επιτρέπει τη χρήση του συγκεκριμένου στελέχους για τη διερεύνηση συνθετικών αλληλεπιδράσεων μέσω γενετικής σάρωσης. Προκειμένου να αναγνωριστούν νέα μόρια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της επαναντιγραφής πραγματοποιήθηκε πείραμα γενετικής σάρωσης.

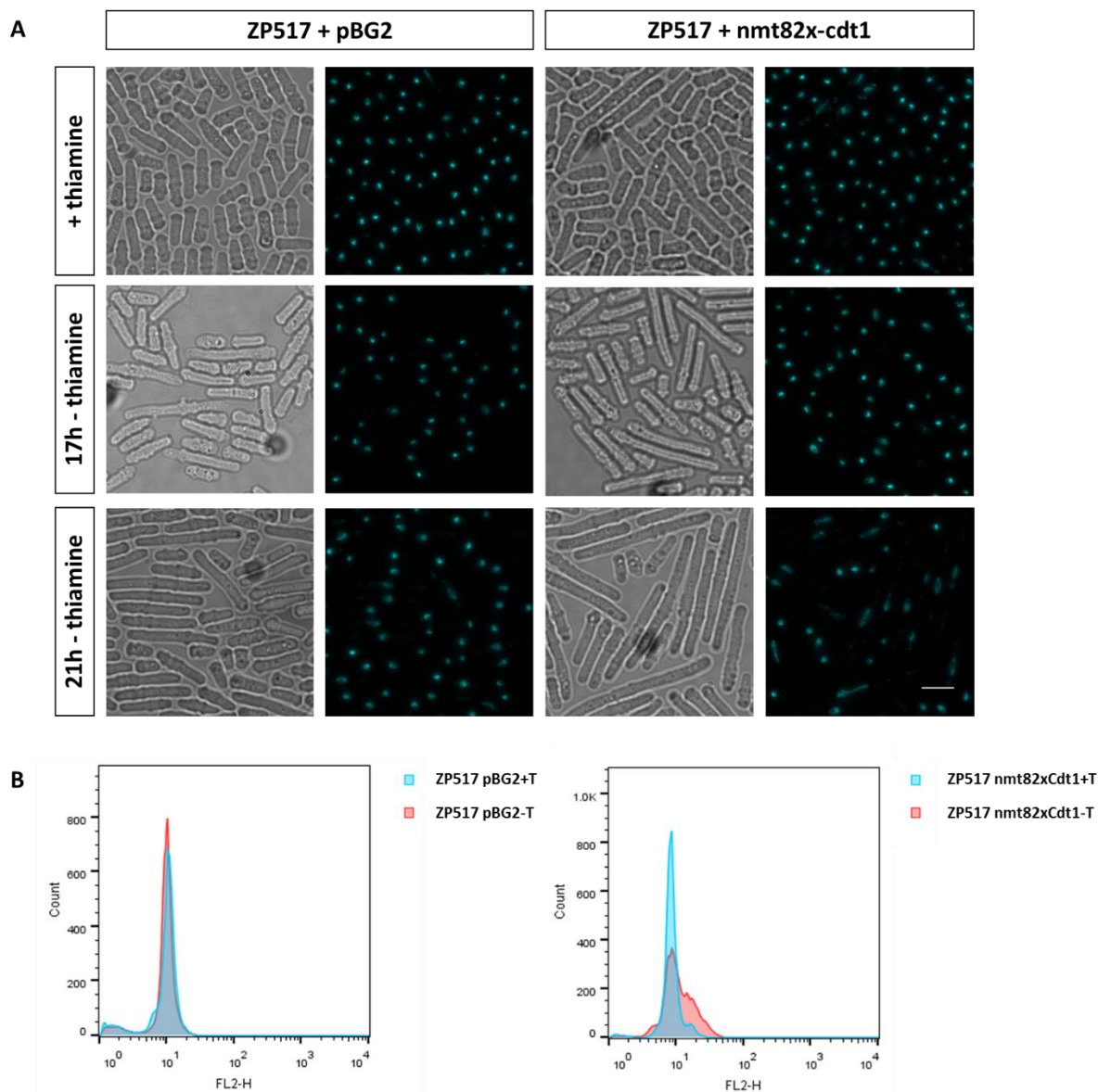
Για τη διαδικασία της σάρωσης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *S.pombe* ZP517 το οποίο προέκυψε έπειτα από διασταύρωση του στελέχους ZP152 (*nmt41-cdc18-d55*) με ένα στέλεχος που φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο *his3-D1* το οποίο το καθιστά ανίκανο να καλλιεργείται απουσία ιστιδίνης στο θρεπτικό του μέσο. Μικροσκοπικά, η επαγωγή του *nmt* υποκινητή στα κύτταρα του στελέχους ZP517 δεν οδηγεί σε εκτεταμένη επιμήκυνση των κυττάρων. Επιπλέον, η χρώση με Hoechst δείχνει πως οι πυρήνες των κυττάρων έχουν φυσιολογική μορφολογία καθώς επίσης δεν παρατηρείται αύξηση του περιεχόμενου DNA με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 4.22). Στόχος του πειράματος της γενετικής σάρωσης ήταν η εύρεση νέων παραγόντων, των οποίων η υπερέκφραση, οδηγεί το στέλεχος ZP517 στην εκδήλωση φαινοτύπου έπειτα από επαγωγή της έκφρασης του *cdc18-d55*, υποδεικνύοντας ότι εμπλέκονται στο μηχανισμό πρόκλησης επαναντιγραφής. Ο παράγοντας Cdt1 αποτελεί παράδειγμα συνθετικής αλληλεπίδρασης με τοον παράγοντα Cdc18, καθώς η υπερέκφρασή του σε κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο *cdc18* σε χαμηλά επίπεδα οδηγεί σε ενίσχυση του φαινομένου της επαναντιγραφής [91]. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε έχει ως βάση το φορέα κλωνοποίησης pBG2. Ο φορέας αυτός φέρει ένα τμήμα του γονιδιώματος που περιλαμβάνει το γονίδιο *his3+*, το οποίο οδηγεί σε ανάπτυξη του στελέχους απουσία ιστιδίνης μόνο όταν βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα [164]. Η βιβλιοθήκη αποτελείται από 2×10^6 περίπου κλώνους οι οποίοι περιέχουν ως ένθεμα τμήματα του γονιδιώματος του *S.pombe* το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 2-10kb με μέσο όρο τα 2.9kb [165].



Εικόνα 4.22 Φαινοτυπική παρατήρηση του στελέχους ZP517. Το στέλεχος φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο *cdc18-d55* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nmt41*. Επαγωγή της έκφρασης του *cdc18-d55* για 21 ώρες δεν οδηγεί σε εμφάνιση του φαινοτύπου της επαναντιγραφής όπως φαίνεται κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων **(A)** (Scale bar: 10μm) αλλά και κατά την ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου DNA με κυτταρομετρία ροής **(B)**.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος σάρωσης, έγινε μετασχηματισμός του στελέχους ZP517 με τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Ως θετικό δείγμα ελέγχου της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *cdt1+* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nmt82*, εφόσον γνωρίζουμε ότι η υπερέκφραση του *Cdt1* στο στέλεχος ZP517 οδηγεί σε επαναντιγραφή του DNA. Ως δείγμα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο άδειος φορέας κλωνοποίησης pBG2. Μετά το μετασχηματισμό, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε θειαμίνη, αλλά όχι ιστιδίνη. Έπειτα από το σχηματισμό αποικιών, αυτές μεταφέρθηκαν σε δύο τρυβλία που δεν περιείχαν θειαμίνη προκειμένου να επαχθεί η υπερέκφραση του γονιδίου *cdc18-d55* και περιείχαν ή όχι τη χρωστική Phloxine B. Η Phloxine B είναι μία χρωστική που συσσωρεύεται στα νεκρά κύτταρα με αποτέλεσμα να βάφει έντονα κόκκινες αποικίες στελεχών που χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιωσιμότητα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα που υπόκεινται σε επαναντιγραφή. Έπειτα από 24 ώρες, οι αποικίες των πιάτων που περιείχαν Phloxine b ελέγχθηκαν για την ύπαρξη έντονου κόκκινου χρώματος, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκαν σε απλό φωτονικό μικροσκόπιο για την ύπαρξη επιμηκυμένου φαινοτύπου. Στην εικόνα 4.23 παρουσιάζεται ο φαινότυπος των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου έπειτα από 21 ώρες επαγωγής του *nmt* υποκινητή σε υγρή καλλιέργεια. Στην περίπτωση του αρνητικού δείγματος που φέρει τον άδειο φορέα κλωνοποίησης ο επιμήκης φαινότυπος δεν είναι έντονος, ενώ η χρώση με Hoechst δείχνει ότι η μορφολογία των πυρήνων μοιάζει περισσότερο φυσιολογική. Αντιθέτως Στο θετικό δείγμα ελέγχου όπου πραγματοποιείται ταυτόχρονη υπερέκφραση του παράγοντα *Cdt1*, παρατηρείται έντονη επιμήκυνση όλων των κυττάρων του πληθυσμού η οποία συνοδεύεται από

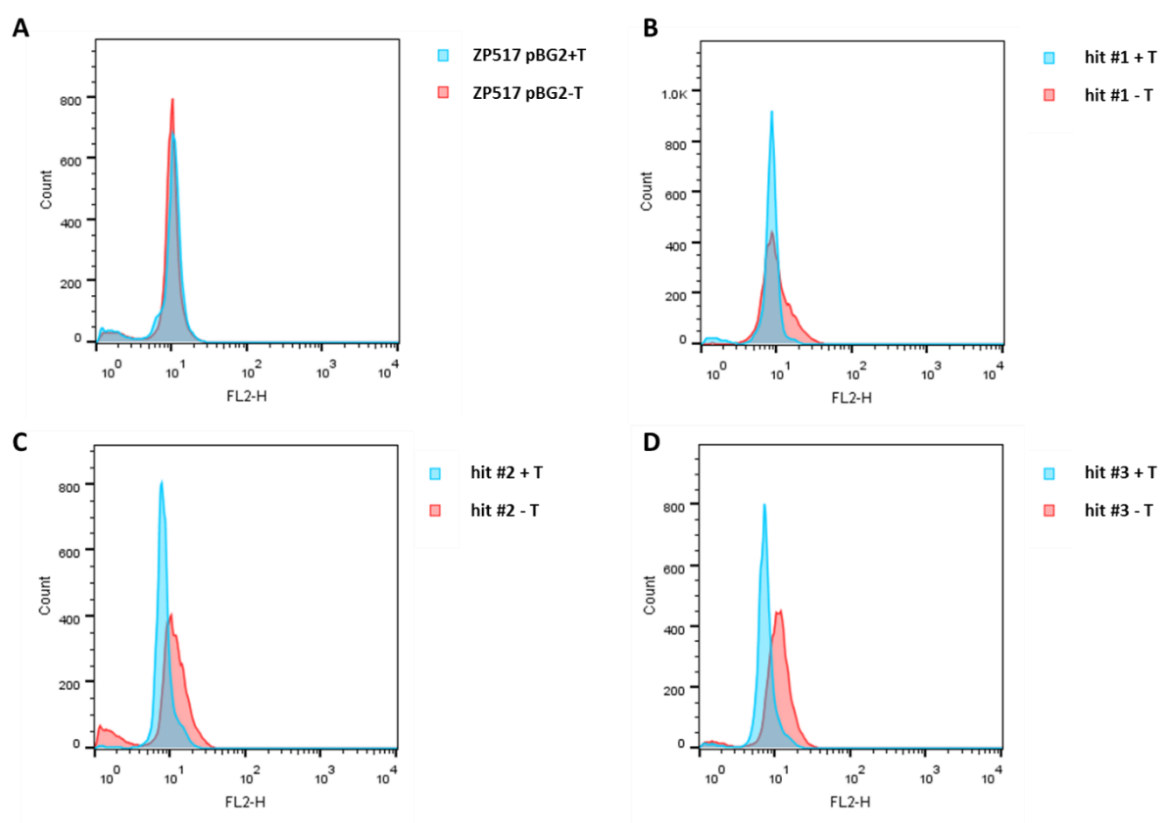
αλλαγή στη μορφολογία των πυρήνων. Περαιτέρω ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι παρατηρείται αύξηση του περιεχόμενου DNA μόνο στο δείγμα θετικού ελέγχου επιβεβαιώνοντας ότι πραγματοποιεί επαναντιγραφή του γονιδιώματός του.



Εικόνα 4.23 Φαινοτυπική παρατήρηση των στελεχών θετικού και αρνητικού ελέγχου. Α) Μικροσκοπική παρατήρηση των δύο στελεχών που περιέχουν τον άδειο φορέα κλωνοποίησης pBG2 (δείγμα αρνητικού ελέγχου) είτε το πλασμίδιο nmt82-Cdt1 (δείγμα θετικού ελέγχου) καθώς και της μορφολογίας των πυρήνων τους έπειτα από χρώση με Hoechst παρουσία θειαμίνης, είτε 17 και 21 ώρες μετά την απομάκρυνση αυτής από το θρεπτικό μέσο (Scale bar: 10μm). **Β)** Μέτρηση του περιεχόμενου DNA των δύο στελεχών ελέγχου με κυτταρομετρία ροής.

Το γονιδίωμα του *S.rombe* έχει μέγεθος περίπου $12,57 \times 10^6$ βάσεις, ενώ η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε φέρει τμήματα μεγέθους $2,9 \times 10^3$.

Επιπλέον κατά τον έλεγχο της ποιότητας της βιβλιοθήκης με πέψεις περιορισμού παρατηρήθηκε ότι περίπου το 50% των πλασμιδίων της βιβλιοθήκης φέρει ένθεμα. Με βάση αυτές τις πληροφορίες υπολογίζεται πως για να καλύψουμε μία φορά το γονιδίωμα του *S.pombe* απαιτείται σάρωση ~9.000 αποικιών. Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθηκαν μικροσκοπικά 50.000 αποικίες, εκ των οποίων επιλέχθηκαν 58 που θεωρήθηκαν θετικές. Οι αποικίες αυτές καλλιεργήθηκαν εκ νέου και ακολούθησε η δευτερογενής σάρωση, κατά την οποία επιβεβαιώθηκε η αύξηση ή μη του συνολικού περιεχόμενου DNA με κυτταρομετρία ροής. Μοναδιαίες αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών οι οποίες επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ιστιδίνης που περιείχε θειαμίνη. Ακολούθησε επαγωγή του υποκινητή *nmt* με απομάκρυνση της θειαμίνης και περαιτέρω επώαση για 21 ώρες. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων και τη χρώση με propidium iodide, ακολούθησε ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου DNA με κυτταρομετρία ροής. Η ανάλυση έδειξε ότι τρεις από τις 58 αποικίες εμφανίζουν όντως αυξημένο περιεχόμενο DNA έπειτα από επαγωγή του υποκινητή *nmt* και κατ' επέκταση υπόκεινται σε επαναντιγραφή (εικόνα 4.24).



Εικόνα 4.24 Ανάλυση περιεχόμενου DNA με κυτταρομετρία ροής. Α) Η επαγωγή του *nmt* υποκινητή στο στέλεχος αρνητικού ελέγχου δεν προκαλεί αύξηση του περιεχόμενου DNA. **Β-Δ)** Τρεις από τις 58 αποικίες που υποβλήθηκαν σε επαγωγή του *nmt* παρουσίασαν αυξημένο περιεχόμενο DNA.

Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση των πλασμιδίων της βιβλιοθήκης από τις θετικές αποικίες. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τα κύτταρα του *S.pombe*. Τα δείγματα που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία αυτή περιλαμβάνουν τόσο το γονιδιωματικό DNA των κυττάρων όσο και τα πλασμίδια που περιέχουν. Στη συνέχεια το συνολικό DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E.coli* DH5α υψηλής απόδοσης μετασχηματισμού (library efficient). Τα κύτταρα *E.coli* μπορούν να αντιγράψουν μόνο το πλασμιδιακό DNA το οποίο περιλαμβάνει βακτηριακή θέση έναρξης της αντιγραφής και όχι τα υπόλοιπα τμήματα γενωμικού DNA του *S.pombe*. Ακολούθησε απομόνωση των πλασμιδίων τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μετασχηματιστεί το στέλεχος ZP517, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι ο παρατηρηθείς φαινότυπος οφείλεται στην ύπαρξη αυτών. Παράλληλα, έγινε αλληλούχιση των γενωμικών τμημάτων που διαθέτουν τα πλασμίδια αυτά, προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα υπεύθυνα γονίδια.

Δύο από τα πλασμίδια που απομονώθηκαν προκάλεσαν επαναντιγραφή στο στέλεχος ZP517 έπειτα από επαγωγή του *nmt* υποκινητή. Η αλληλούχιση αυτών έδειξε ότι και τα δύο περιείχαν μια περιοχή που περιλαμβάνει το γονίδιο *nmt1* μαζί με τον υποκινητή του. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με το μηχανισμό της γονιδιακής μετατροπής. Κατά τη γονιδιακή μετατροπή δύο περιοχές με υψηλή ομολογία αλληλεπιδρούν έτσι ώστε να επιτραπεί ο ανασυνδυασμός μεταξύ τους και η μία να μετασχηματιστεί από την άλλη. Στην προκειμένη περίπτωση ο υποκινητής *nmt41* του στελέχους ZP517 διαφέρει μόλις τρεις βάσεις από τον αγρίου τύπου υποκινητή του γονιδίου *nmt1*. Έτσι λοιπόν γονιδιακή μετατροπή μεταξύ του υποκινητή *nmt41* του στελέχους ZP517 και του *nmt1* του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης θα μπορούσε να δημιουργήσει ένα στέλεχος το οποίο φέρει το γονίδιο *cdc18-d55* υπό τον έλεγχο του ισχυρότερου *nmt1* υποκινητή εξηγώντας έτσι τον ενισχυμένο φαινότυπο επαναντιγραφής που παρατηρείται στα κύτταρα έπειτα από επαγωγή του υποκινητή.

Φαίνεται λοιπόν ότι για τη διερεύνηση νέων μορίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της επαναντιγραφής μέσω γενετικής σάρωσης, απαιτείται η χρήση διαφορετικού στελέχους *S.pombe* που να μη φέρει το γονίδιο *cdc18* κάτω από τον έλεγχο του επαγόμενου υποκινητή *nmt1*. Μία εναλλακτική λύση αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο φέρει τη μεταλλαγή *cdc18-T6A*. Από το μετάλλαγμα αυτό απουσιάζουν 6 θέσεις φωσφορυλίωσης από τη CDK με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης.

Επομένως τα επίπεδα της πρωτεΐνης Cdc18 παραμένουν υψηλότερα από το φυσιολογικό χωρίς τη χρήση επαγόμενου υποκινητή [187].

4.2 Μελέτη της γονιδιακής ενίσχυσης σε καρκινικά δείγματα ασθενών του TCGA

Οι παράγοντες Cdt1 και Cdc6 παίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA [3]. Η μη σωστή ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών, καθώς και η εκτοπική έκφρασή τους έχει δείχθει ότι οδηγεί σε επαναπυροδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου, προκαλώντας έτσι επαναντιγραφή και υπερδιπλασιασμό τμημάτων του γονιδιώματος [99]. Επιπλέον, κατά την επαναντιγραφή δημιουργούνται εκτεταμένες βλάβες στο γονιδίωμα όπως μονές και διπλές θραύσεις οδηγώντας τελικά σε γονιδιωματική αστάθεια, η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος [96, 115, 116]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το Cdc6 και το Cdt1 εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, καθώς επίσης ότι σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων αυτών, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, σχετίζονται με κακή πρόγνωση της νόσου και χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης [188].

Κατά την επαναντιγραφή, οι διχάλες που δημιουργούνται από την επαναπυροδότηση των θέσεων έναρξης σταματούν και τελικά καταρρέουν [105, 189]. Οι ασταθείς αυτές δομές οδηγούν τελικά στη δημιουργία μονών ή διπλών θραύσεων στο DNA οι οποίες ενεργοποιούν ATR-εξαρτώμενα σημεία ελέγχου κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου [108]. Η επίλυση των δομών αυτών από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να οδηγήσουν είτε σε ενίσχυση μίας περιοχής του γονιδιώματος με τη μορφή εξτρα-χρωμοσωμικού DNA, είτε στην ενσωμάτωση της ενισχυμένης περιοχής στο γονιδίωμα προκαλώντας ενδο-χρωμοσωμικό διπλασιασμό της συγκεκριμένης περιοχής.

Η γονιδιακή ενίσχυση αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς ενεργοποίησης ογκογονιδίων και σχετίζεται τόσο με την πρόγνωση όσο και με τη στοχευμένη θεραπεία της νόσου. Γονίδια όπως MYC, ERBB2 (HER2/neu), CCND1, EGFR εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα ενίσχυσης σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του μαστού και του πνεύμονα, ενώ τα επίπεδα ενίσχυσης των γονιδίων αυτών σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου και την επιβίωση των ασθενών [190, 191]. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της

υπερκέφρασης του αδειοδοτικού παράγοντα Cdt1 και των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα HER2/neu, οδηγώντας στην υπόθεση ότι το Cdt1 πιθανά εμπλέκεται στην ενίσχυση του γενετικού τόπου του υποδοχέα μέσω της διαδικασίας της επαναντιγραφής (Διδακτορική διατριβή Ιωάννας-Ελένης Συμεωνίδου).

Με βάση αυτές τις πληροφορίες θελήσαμε να μελετήσουμε την ενδεχόμενη συσχέτιση της έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 με τη γονιδιακή ενίσχυση σε δείγματα ασθενών με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, χρησιμοποιώντας διαθέσιμα δεδομένα από το TCGA (The Cancer Genome Atlas project). Επιπλέον, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της πιθανής συμβολής των μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA στη γονιδιακή ενίσχυση που προκαλείται κατά την υψηλή έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6.

4.2.1 Μελέτη του ρόλου της επαναντιγραφής στην εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με καρκίνο

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* και της γονιδιακής ενίσχυσης, χρησιμοποιήθηκαν γονιδιωματικά δεδομένα από το TCGA, που αφορούν σε οκτώ διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Η αρχική διερεύνηση των σετ δεδομένων για κάθε τύπο καρκίνου έγινε μέσα από την πλατφόρμα του cBio Cancer Genomics Portal (<http://cbioportal.org>) [192, 193]. Η πρόσβαση των δεδομένων είναι ανοιχτή και έγινε μέσω του ειδικού πακέτου *cgdsr* της R. Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των προς μελέτη παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από αλληλούχιση mRNA (RNA Seq V2 RSEM), ενώ για τον προσδιορισμό των αντιγράφων των αντίστοιχων γενετικών τόπων χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από ανάλυση μικροσυστοιχιών (GISTIC score). Το Gistic score περιγράφει την απόκλιση των δειγμάτων από την διπλοειδή κατάσταση. Παίρνει διακριτές τιμές (-2 έως 2) και διαχωρίζει τα δείγματα σε 5 κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του εκάστοτε γονιδίου. Οι τιμές -2 και -1 περιγράφουν την απώλεια και των δύο ή του ενός αλληλομόρφου, η τιμή 0 περιγράφει τη διπλοειδή κατάσταση, ενώ η τιμές 1 και 2 αναφέρονται σε ενίσχυση και εκτεταμένη ενίσχυση των γονιδίων.

4.2.1.1 Υψηλή έκφραση των παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης μεμονωμένων γενετικών τόπων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

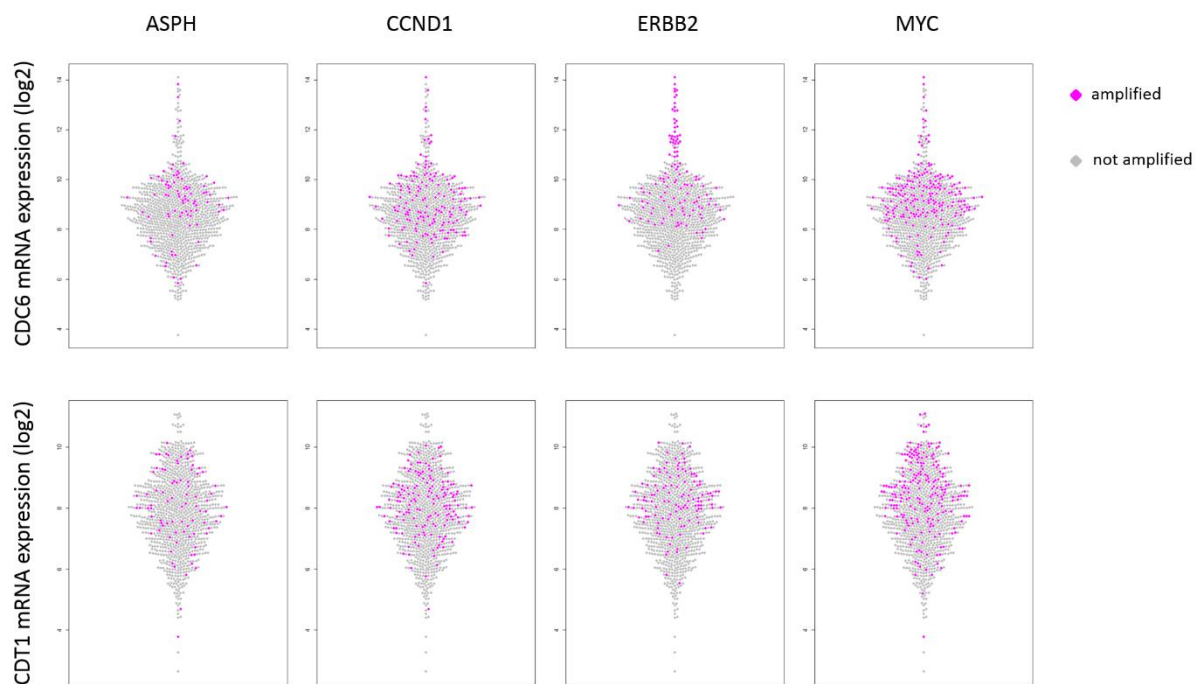
Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη της γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Το σετ δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε (Breast invasive carcinoma, TCGA, n=960) περιλαμβάνει ως επί το πλείστο ασθενείς με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (73,5%) και διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (18,7%) του μαστού. Για την ανάλυση επιλέχθηκαν γονίδια που εμφανίζουν ενίσχυση (GISTIC score=2) σε αυξημένη συχνότητα στο συγκεκριμένο σετ δεδομένων. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν φαίνονται στον πίνακα 4.5, καθώς επίσης οι συντεταγμένες τους στο

γονιδίωμα, αλλά και η συχνότητα εμφάνισης γονιδιακής ενίσχυσης στο σύνολο των ασθενών.

Πίνακας 4.5 Γενετικοί τόποι με αυξημένη συχνότητα γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

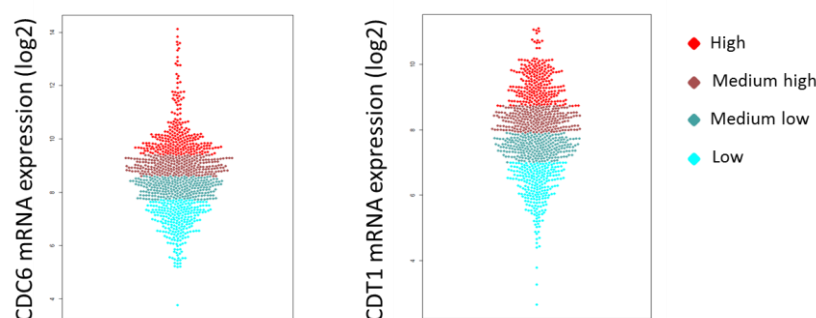
Γενετικός τόπος	Συντεταγμένες	Συχνότητα ενίσχυσης
ASPH	8q12.3	8.4%
CCND1	11q13.3	16.4%
ERBB2	17q12	12.3%
MYC	8q24.21	21.2%

Στην εικόνα 4.25 απεικονίζονται οι κατανομές της έκφρασης των παραγόντων Cdc6 (πάνω) και Cdt1 (κάτω) ενώ με μωβ επισημαίνονται τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε ενίσχυση στους γενετικούς τόπους ASPH, CCND1, ERBB2 και MYC. Μέσα από αυτήν την απεικόνιση παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα τα οποία εμφανίζουν ενίσχυση κάποιου τόπου (GISTIC score=2) τείνουν να έχουν υψηλότερα επίπεδα Cdt1 ή Cdc6. Η συσχέτιση αυτή φαίνεται να είναι πιο έντονη στην περίπτωση των γενετικών τόπων MYC και ERBB2 σε σχέση με την έκφραση του παράγοντα Cdc6. Ωστόσο τα γονίδια CDC6 και ERBB2 βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις του χρωμοσώματος 17 επομένως οποιαδήποτε συσχέτιση οφείλεται πιθανά σε συν-ενίσχυση της ευρύτερης περιοχής του χρωμοσώματος, επομένως δεν λάβαμε υπόψιν το συγκεκριμένο ζεύγος γονιδίων στα επόμενα βήματα της ανάλυσης.



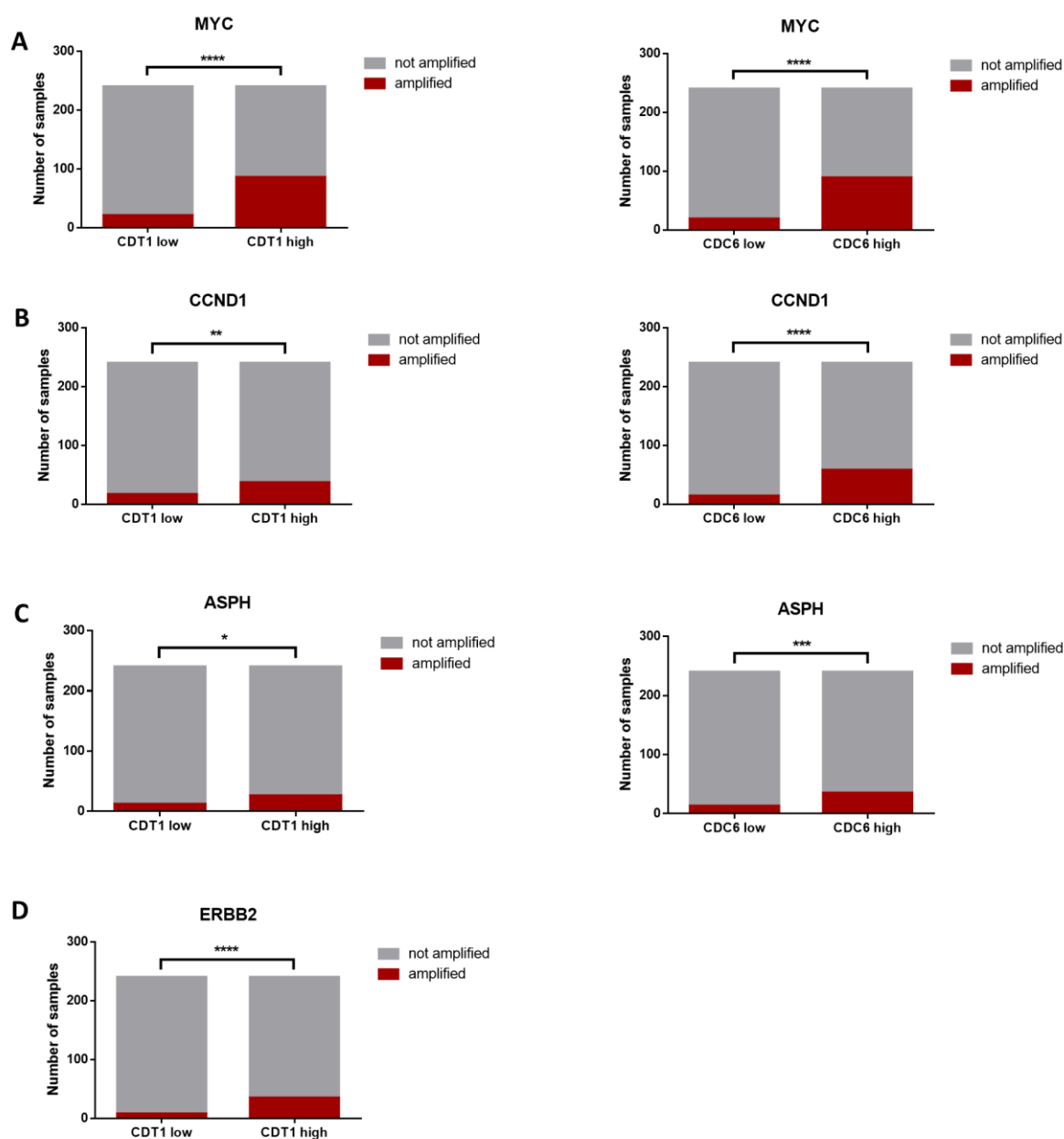
Εικόνα 4.25 Κατανομή έκφρασης των παραγόντων Cdc6 και Cdt1. Ο άξονας y παρουσιάζει τα επίπεδα έκφρασης mRNA του παράγοντα CDC6 (πάνω) και του CDT1 (κάτω) Κάθε κουκίδα αναπαριστά έναν ασθενή, ενώ με μωβ χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε ενίσχυση (GISTIC score=2) των γενετικών τόπων ASPH, CCND1, ERBB2 και MYC.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν τα επίπεδα έκφρασης του Cdc6 ή του Cdt1 σχετίζονται με την γονιδιακή ενίσχυση στους μεμονωμένους γενετικούς τόπους που επιλέξαμε (πίνακας 4.5), αρχικά χωρίσαμε τους ασθενείς σε 4 ισομεγέθεις ομάδες (n=240) με βάση την έκφραση του Cdt1 (ή του Cdc6). Στην εικόνα 4.26 παρουσιάζεται σχηματικά η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την έκφραση των Cdc6 και Cdt1.



Εικόνα 4.26 Κατηγοριοποίηση ασθενών με βάση την έκφραση των παραγόντων Cdc6 και Cdt1. Ο άξονας y παρουσιάζει τα επίπεδα έκφρασης mRNA του παράγοντα CDC6 και του CDT1 Κάθε κουκίδα αναπαριστά έναν ασθενή. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες (high, medium high, medium low και low) με βάση την έκφραση κάθε παράγοντα.

Στη συνέχεια για κάθε μία ομάδα μετρήθηκε ο αριθμός των ασθενών που έφεραν εκτεταμένη ενίσχυση (GISTIC score=2) στον εκάστοτε γενετικό τόπο. Από την σύγκριση των ομάδων ασθενών με τη υψηλότερη (high) και χαμηλότερη (low) έκφραση είτε Cdt1 είτε Cdc6 προέκυψε ότι τα υψηλά επίπεδα των δύο παραγόντων σχετίζονται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης των γονιδίων ASPH, CCND1, MYC και ERBB2 (εικόνα 4.27). Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης γονιδιακής ενίσχυσης στα δείγματα με αυξημένη έκφραση των Cdt1 και Cdc6 αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική με βάση τη δοκιμή χ^2 .



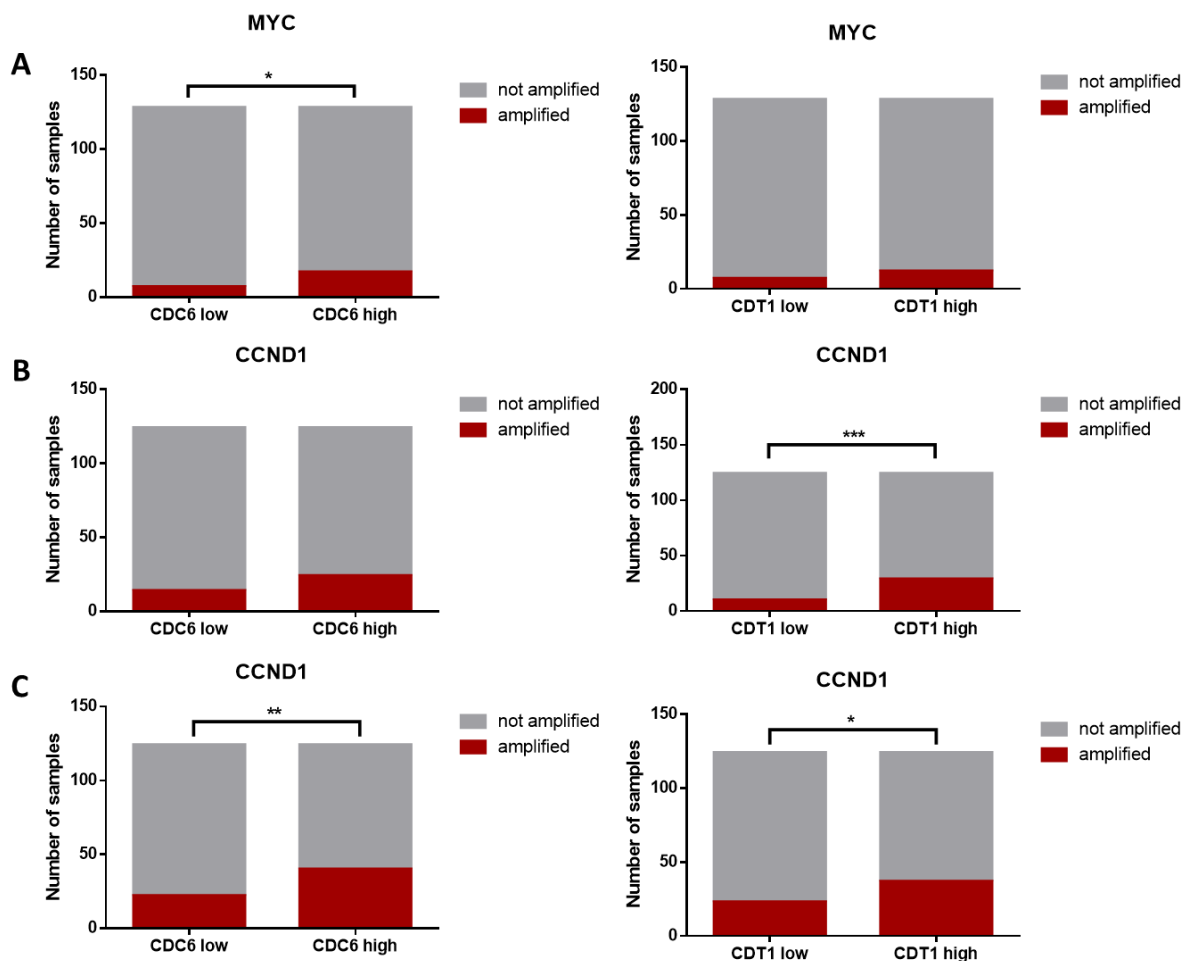
Εικόνα 4.27 Υψηλά επίπεδα mRNA των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Οι

ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες (n=240) με βάση την έκφραση του Cdt1 ή Cdc6. Για κάθε κατηγορία προσδιορίστηκε ο αριθμός των δειγμάτων με ενίσχυση στους γενετικούς τόπους των γονιδίων MYC (**A**), CCND1 (**B**), ASPH (**C**) και ERBB2 (**D**). Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι ομάδες με τη χαμηλότερη (low) και υψηλότερη (high) έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6, ενώ με κόκκινο παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που φέρουν γονιδιακή ενίσχυση (GISTIC score=2) του εκάστοτε γονιδίου. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμή χ^2 .

4.2.1.2 Υψηλή έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης μεμονωμένων γενετικών τόπων σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε αν η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 και της ενίσχυσης μεμονωμένων τόπων, αποτελεί χαρακτηριστικό του καρκίνου του μαστού ή ισχύει και σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα του TCGA που αφορούσαν σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (n=512), πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (n=496) και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (n=510). Οι συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου επιλέχθηκαν διότι φέρουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων (~500) και επιτρέπουν το διαχωρισμό των ασθενών σε ομάδες. Στην ανάλυση λάβαμε υπόψη τους γενετικούς τόπους MYC και CCND1 καθώς οι ASPH και ERBB2 στους συγκεκριμένους τύπους καρκίνου εμφανίζουν πολύ μικρά ποσοστά ενίσχυσης (<6%). Όπως και στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, για κάθε σετ δεδομένων οι ασθενείς χωρίστηκαν με βάση την έκφραση του Cdt1 ή του Cdc6 σε 4 ισομεγέθεις ομάδες. Σε κάθε ομάδα υπολογίστηκε ο αριθμός δειγμάτων με ενίσχυση (GISTIC score=2), και ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των ομάδων με τα υψηλότερα και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και στατιστική ανάλυση με τη δοκιμή χ^2 . Διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα η έκφραση του Cdc6 σχετίζεται με την ενίσχυση του ογκογονιδίου MYC (P value= 0.0320). Παρόμοια συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει και με τον παράγοντα Cdt1 ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική. Σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα τα επίπεδα του Cdt1 φαίνεται να σχετίζονται με την ενίσχυση του γενετικού τόπου του CCND1 ((P value= 0.0009). Η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων του Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης του Ccnd1 στους ίδιους ασθενείς δεν είναι στατιστικά σημαντική. Τέλος στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου τόσο τα επίπεδα του Cdt1 όσο και του Cdc6 φαίνεται να σχετίζονται θετικά με τη

γονιδιακή ενίσχυση του γενετικού τόπου Ccnd1 (P value= 0.0379 και P value=0.0083 αντίστοιχα (εικόνα 4.28).



Εικόνα 4.28 Υψηλά επίπεδα mRNA των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζονται θετικά με την ενίσχυση των γονιδίων MYC και CCND1 σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (A), πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (B) και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (C). Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες με βάση την έκφραση του Cdt1 ή Cdc6. Για κάθε κατηγορία προσδιορίστηκε ο αριθμός των δειγμάτων με ενίσχυση στους γενετικούς τόπους των γονιδίων MYC και CCND1. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι ομάδες με τη χαμηλότερη (low) και υψηλότερη (high) έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6, ενώ με κόκκινο παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που φέρουν γονιδιακή ενίσχυση (GISTIC score=2) του εκάστοτε γονιδίου. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμή χ^2 .

Παρατηρούμε λοιπόν ότι η αυξημένη έκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 συσχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης συγκεκριμένων γενετικών τόπων και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, το πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα και το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Η συσχέτιση δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις που

μελετήθηκαν στατιστικά σημαντική, ωστόσο αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος των δειγμάτων (σε σύγκριση με τον αριθμό δειγμάτων με καρκίνου του μαστού).

4.2.1.3 Υψηλή έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου

Παρατηρήσαμε ότι τα αυξημένα επίπεδα των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζονται με την ενίσχυση μεμονωμένων τόπων που διερευνήθηκαν σε δείγματα ασθενών με διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Ωστόσο η ανάλυση αυτή δεν μας δίνει μία ολοκληρωμένη εικόνα για την ενίσχυση που συμβαίνει κατά μήκος του γονιδιώματος των ασθενών αυτών. Έτσι λοιπόν, στη συνέχεια έγινε μια προσπάθεια προσδιορισμού των συνολικών επιπέδων ενίσχυσης του κάθε ασθενή, προκειμένου να διαπιστωθεί αν σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα έκφρασης των Cdt1 και Cdc6 σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

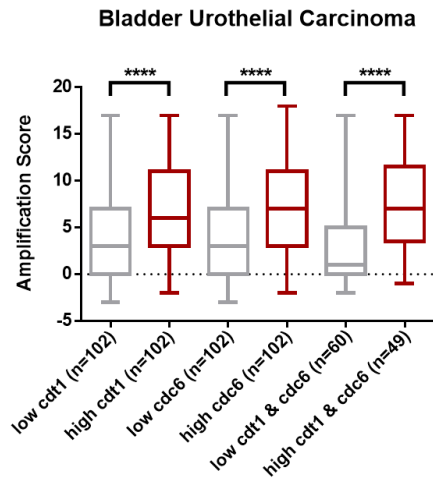
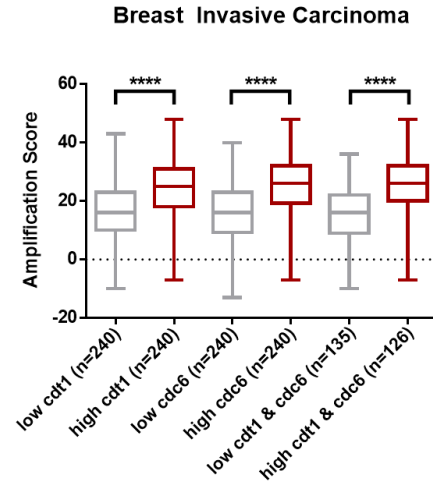
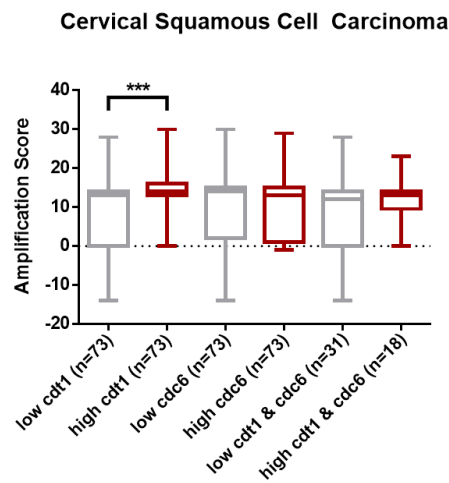
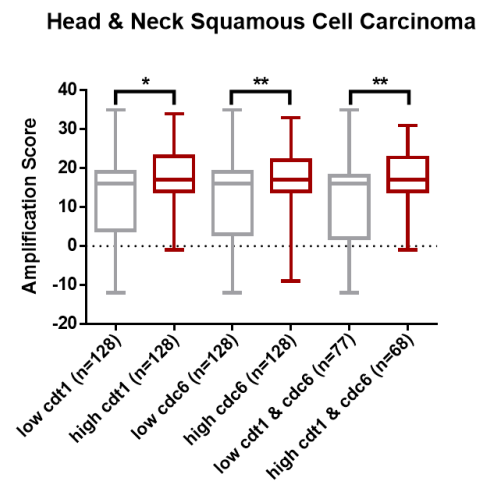
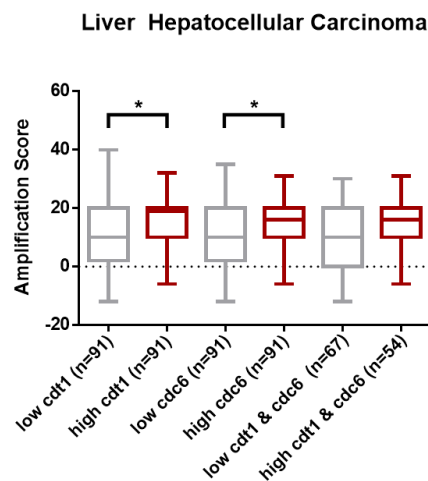
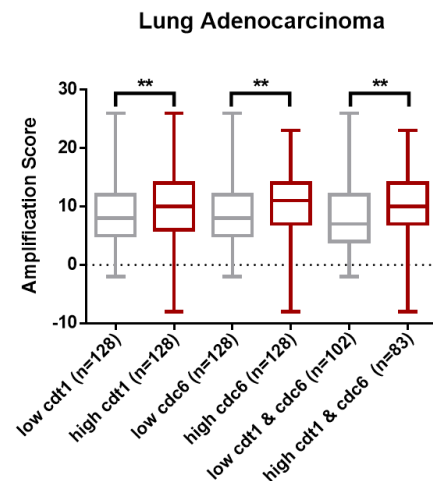
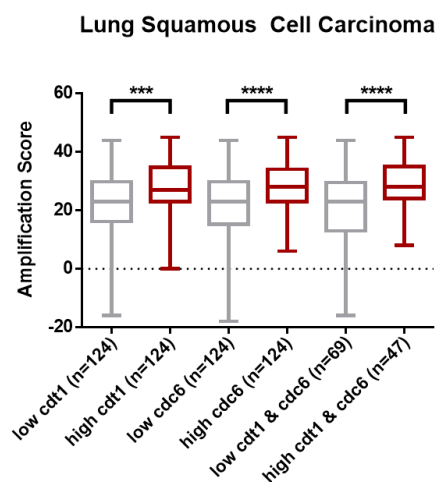
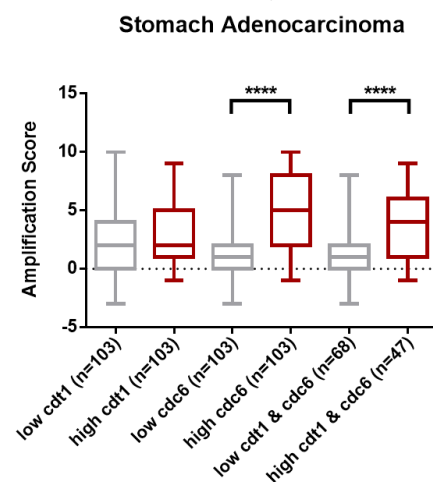
Για τον υπολογισμό των επιπέδων ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος δημιουργήθηκε μια μετρική που ονομάστηκε total amplification score. Για κάθε τύπο καρκίνου που αναλύθηκε, βρέθηκαν τα γονίδια εκείνα που εμφανίζουν ενίσχυση σε ένα ποσοστό >10% του συνόλου των ασθενών. Επειδή σε αρκετές περιπτώσεις η ενίσχυση συμβαίνει σε μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό γονιδίων (με παρόμοια επίπεδα ενίσχυσης), επιλέχθηκε ένα γονίδιο από κάθε τέτοια περιοχή. Με τον τρόπο αυτό τα γονίδια που επιλέχθηκαν τελικά για κάθε τύπο καρκίνου αντιπροσωπεύουν καλύτερα το σύνολο του γονιδιώματος και το αποτέλεσμα της ανάλυσης δεν διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των χρωμοσωμικών περιοχών που ενισχύονται. Ο παρακάτω πίνακας περιλαμβάνει τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου στους οποίους πραγματοποιήθηκε η ανάλυση, καθώς επίσης αναγράφεται ο αριθμός δειγμάτων και ο αριθμός γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του amplification score (τα ονόματα των γονιδίων αναγράφονται αναλυτικά στους πίνακες 3.29 έως 3.36 της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι»).

Τύπος καρκίνου	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό amplification score
Αδενοκαρκίνωμα στομάχου	412	5
Αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα	512	14
Διηθητικό καρκίνωμα του μαστού	960	29
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	364	20
Ουροθηλιακό καρκίνωμα	408	11
Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου	510	18
Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα	496	25
Πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας	292	16

Στη συνέχεια έγινε η λήψη δεδομένων για τον αριθμό αντιγράφων (GISTIC score) των γονιδίων που επιλέχθηκαν. Για κάθε ασθενή υπολογίστηκε το amplification score ως το άθροισμα των GISTIC scores για το σύνολο των γονιδίων που επιλέχθηκαν. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και πάλι σε 4 ομάδες με βάση την έκφραση του παράγοντα Cdt1 ή του Cdc6, ενώ συγκρίθηκαν οι κατανομές των amplification scores στις ομάδες με τη χαμηλότερη και υψηλότερη έκφραση των Cdt1 και Cdc6. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney.

Μέσα από την ανάλυση αυτή παρατηρήθηκε ισχυρή, στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Cdt1 και του Cdc6 μεμονωμένα και των συνολικών επιπέδων γονιδιακής ενίσχυσης των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνωμα (Bladder urothelial carcinoma), διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Breast invasive carcinoma), πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (Head and neck squamous cell carcinoma), αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (Lung adenocarcinoma), πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (Lung squamous cell carcinoma) και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Liver hepatocellular carcinoma). Συσχέτιση μεταξύ γονιδιακής ενίσχυσης

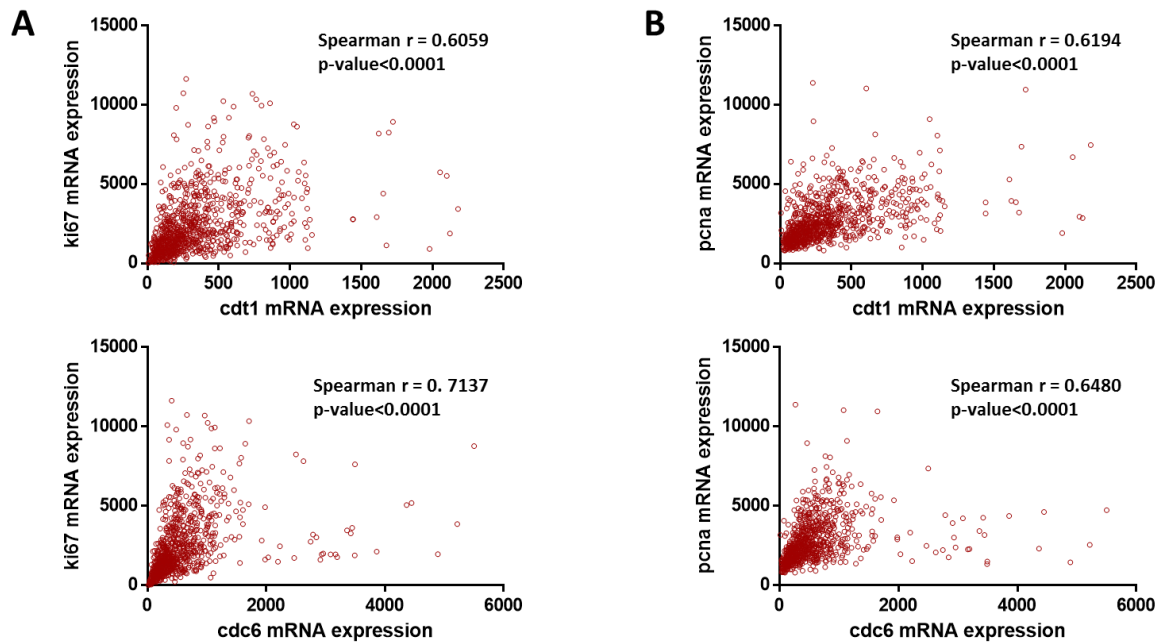
και του Cdt1 (αλλά όχι του Cdc6) παρατηρήθηκε σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας (Cervical squamous cell carcinoma), ενώ συσχέτιση με το Cdc6 (και όχι με το Cdt1 παρατηρήθηκε σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα στομάχου (Stomach adenocarcinoma). Επιπλέον έγινε σύγκριση μεταξύ ασθενών που είχαν υψηλά ή χαμηλά επίπεδα και των δύο παραγόντων, όπου και πάλι παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση η οποία ήταν στατιστικά σημαντική με εξαίρεση τους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας (εικόνα 4.29).



Εικόνα 4.29 Υψηλά επίπεδα mRNA των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης ασθενών από διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Για κάθε τύπο καρκίνου βρέθηκαν τα γονίδια που έφεραν ενίσχυση σε ποσοστό >10% του συνόλου των ασθενών. Ως amplification score ορίστηκε το άθροισμα των GISTIC scores των γονιδίων που επιλέχθηκαν για κάθε τύπο καρκίνου. Η σύγκριση των κατανομών των amplification scores έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney.

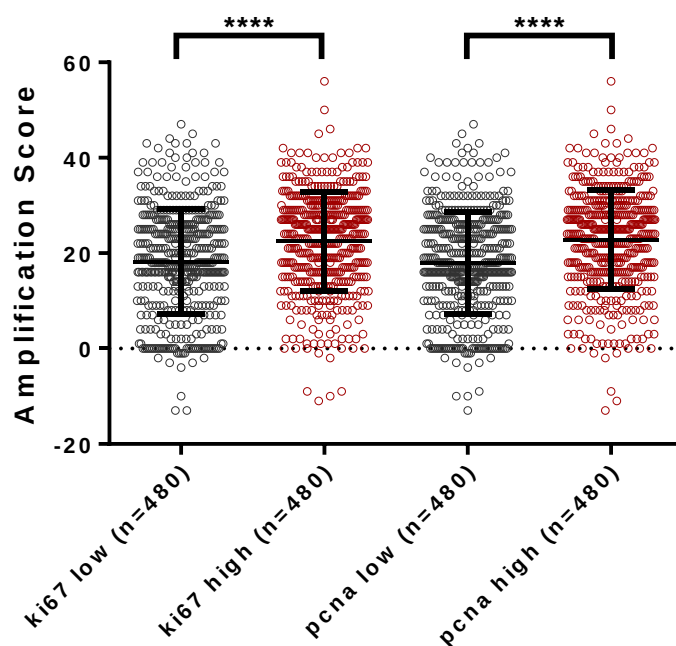
4.2.1.4 Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Cdt1/Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης είναι ανεξάρτητη της κατάστασης πολλαπλασιασμού

Η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη της σωστής λειτουργίας τους. Στις περιπτώσεις καρκινικών ιστών όπου διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ κυτταρικής διαίρεσης και θανάτου, ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού αυξάνεται. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως το Ki67 ή το PCNA (proliferating cell nuclear antigen) χρησιμοποιούνται ευρέως ως προγνωστικοί δείκτες στη διάγνωση του καρκίνου, μιας και αυξημένα επίπεδα αυτών έχουν συσχετιστεί με επιθετική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων [194]. Εκτός από την επιθετικότητα της νόσου, ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων έχει συσχετιστεί με γονιδιακή ενίσχυση, συγκεκριμένα του ανδρογονικού υποδοχέα AR σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη [195]. Με βάση αυτές τις πληροφορίες θελήσαμε να δούμε αν η γονιδιακή ενίσχυση που παρατηρήθηκε παρουσία αυξημένων επιπέδων των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των δειγμάτων. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού οι οποίοι ήταν επαρκείς σε αριθμό για ανάλυση. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι στους ασθενείς αυτούς υπάρχει έντονη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1/Cdc6 και των δεικτών πολλαπλασιασμού Ki67 και PCNA.



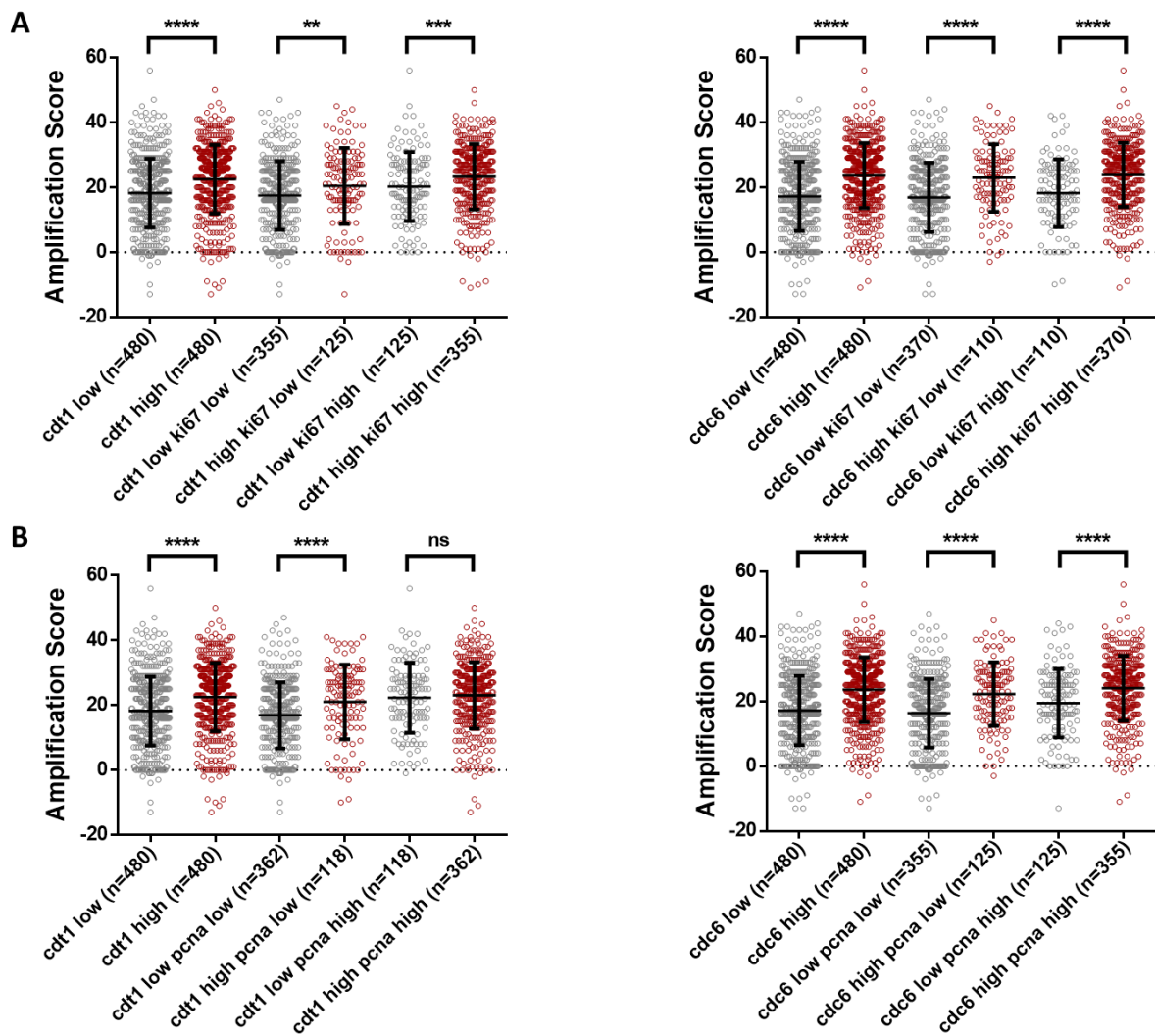
Εικόνα 4.30 Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ των παραγόντων *Cdt1/Cdc6* και των δεικτών πολλαπλασιασμού *Ki67* και *PCNA* σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Η έκφραση των παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* εμφανίζει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση τόσο με τον παράγοντα *Ki67* (**A**) όσο και με το *PCNA* (**B**). Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης *Spearman*.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η γονιδιακή ενίσχυση στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού σχετίζεται με την επαναντιγραφή και τα επίπεδα έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* ανεξάρτητα της αυξημένης πολλαπλασιαστικής ικανότητας των όγκων, μελετήσαμε τη συσχέτιση μεταξύ των *Cdt1/Cdc6* σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα των δεικτών πολλαπλασιασμού *Ki67* και *PCNA*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα ασθενών με καρκίνο του μαστού του TCGA. Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων *Ki67* και *PCNA* χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλούχισης RNA. Για κάθε έναν παράγοντα οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση την έκφρασή τους. Κάθε δείγμα με τιμή έκφρασης μικρότερη της διαμέσου χαρακτηρίστηκε ως δείγμα χαμηλής έκφρασης και κάθε δείγμα με τιμή έκφρασης μεγαλύτερη της διαμέσου χαρακτηρίστηκε ως δείγμα υψηλής έκφρασης του εκάστοτε παράγοντα. Η σύγκριση των κατανομών των amplification scores μεταξύ των ασθενών με υψηλή και χαμηλή έκφραση των δεικτών πολλαπλασιασμού (Εικόνα 4.31) υποδεικνύει ότι η αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των δειγμάτων σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης.



Εικόνα 4.31 Αυξημένα επίπεδα των παραγόντων Ki67 και PCNA σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Οι ασθενείς χωρίστηκαν με βάση την έκφραση του κάθε παράγοντα σε δύο ισομεγέθεις ομάδες. Η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε με τη δοκιμασία Mann-Whitney.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν η συσχέτιση μεταξύ της γονιδιακής ενίσχυσης και της έκφρασης παραγόντων Cdt1 και Cdc6 εξακολουθεί να υπάρχει ανεξάρτητα της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό οι ομάδες ασθενών με υψηλά και χαμηλά επίπεδα έκφρασης των δεικτών Ki67 και PCNA χωρίστηκαν περαιτέρω με βάση την έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σε δύο κατηγορίες ενώ συγκρίθηκαν οι κατανομές των amplification scores για κάθε υποκατηγορία (εικόνα 4.32). Παρατηρήθηκε ότι η συσχέτιση μεταξύ Cdt1/Cdc6 και γονιδιακής ενίσχυσης είναι στατιστικά σημαντική ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης του Ki67 (εικόνα 4.32 A). Τέλος, σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση του δείκτη PCNA υπάρχει σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων έκφρασης Cdt1/Cdc6 και γονιδιακής ενίσχυσης (εικόνα 4.32 B).



Εικόνα 4.32 Η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* και της γονιδιακής ενίσχυσης είναι ανεξάρτητη από την πολλαπλασιαστική ικανότητα των δειγμάτων. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση την έκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* και ακολουθήσε περαιτέρω ομαδοποίηση με βάση την έκφραση των *Ki67* (A) και *PCNA* (B). Η σύγκριση των κατανομών κάθε υποκατηγορίας έγινε με δοκιμή Mann-Whitney.

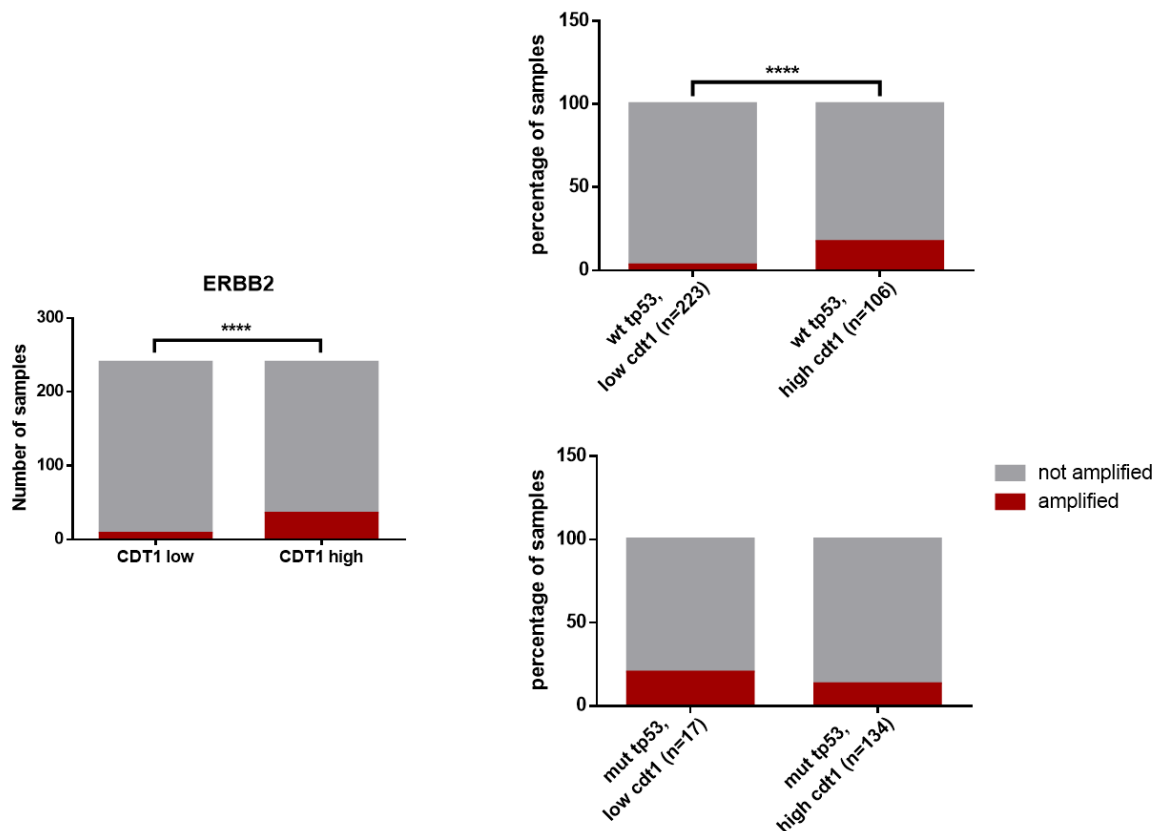
Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι τα επίπεδα των δεικτών πολλαπλασιασμού (και κατ' επέκταση ο ρυθμός πολλαπλασιασμού) σχετίζονται με την γονιδιακή ενίσχυση σε δείγματα καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει τη γονιδιακή ενίσχυση, εφόσον σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση των δεικτών *Ki67* και *PCNA* η αύξηση των επιπέδων των αδειοδοτικών παραγόντων *Cdt1/Cdc6* σχετίζεται με αυξημένη γονιδιακή ενίσχυση. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα επίπεδα έκφρασης των

αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σχετίζονται με τη γονιδιακή ενίσχυση ανεξάρτητα από την πολλαπλασιαστική ικανότητα των δειγμάτων.

4.2.1.5 Η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης του ERBB2 υφίσταται παρουσία λειτουργικού p53

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του Cdt1 οδηγεί σε ανευπλοειδία και γονδιωματική αστάθεια σε όγκους που χαρακτηρίζονται από μη λειτουργικές μορφές της πρωτεΐνης p53 [99, 115]. Με βάση αυτό θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των Cdc6 και Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης επηρεάζεται από την ύπαρξη μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53.

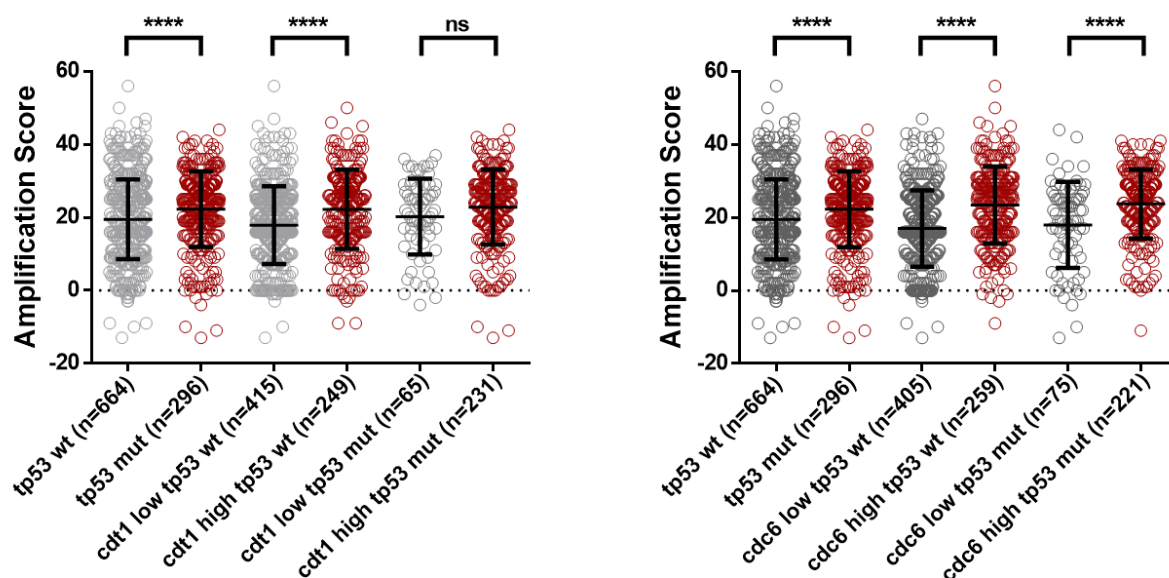
Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση που έχει η κατάσταση του γονιδίου TP53 (μεταλλαγμένο ή φυσιολογικό) στη σχέση μεταξύ έκφρασης Cdt1 και ενίσχυσης του γονιδίου ERBB2 σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Από τους συνολικά 960 ασθενείς, οι 296 παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονιδιακό τόπο του TP53. Παρατηρήθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα του Cdt1 σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα ενίσχυσης του γονιδίου ERBB2 μόνο όμως στα δείγματα που είχαν φυσιολογικό TP53. Αντιθέτως, σε ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (εικόνα 4.33).



Εικόνα 4.33 Υψηλά επίπεδα mRNA του παραγόντων *Cdt1* σχετίζονται θετικά με την ενίσχυση του γονιδίου *ERBB2* μόνο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που φέρουν φυσιολογικό γονίδιο *TP53*. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 ισομεγέθεις ομάδες με βάση την έκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα *Cdt1* και ακολουθήσε περαιτέρω ομαδοποίηση με βάση την κατάσταση του γονιδίου *TP53* (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένο). Σε κάθε κατηγορία προσδιορίστηκε ο αριθμός των δειγμάτων με ενίσχυση στο γενετικό τόπου *ERBB2* (*GISTIC score*=2). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμή χ^2 .

Στη συνέχεια μελετήθηκε και η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του *Cdt1* ή του *Cdc6* και της συνολικής γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με φυσιολογικό ή μη *TP53*. Οι ασθενείς αρχικά ομαδοποιήθηκαν σε 4 ομάδες με βάση την έκφραση του *Cdt1* και *Cdc6* ωστόσο υπήρχαν ελάχιστα δείγματα με χαμηλή έκφραση *Cdc1* ή *Cdc6* και μεταλλαγμένο *TP53*. Για το λόγο αυτό οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Ως δείγματα χαμηλής έκφρασης (low) χαρακτηρίστηκαν εκείνα που είχαν τιμές έκφρασης χαμηλότερα από τη διάμεσο, ενώ τα δείγματα που είχαν τιμές έκφρασης μεγαλύτερες από τη διάμεσο αποτέλεσαν τα δείγματα υψηλής έκφρασης (high). Στη συνέχεια οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση την κατάσταση του παράγοντα *TP53*. Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε το total amplification score. Τέλος, συγκρίθηκαν οι κατανομές των amplification scores των ασθενών με υψηλή ή χαμηλή έκφραση των παραγόντων *Cdt1* ή *Cdc6* και φυσιολογικό ή μεταλλαγμένο *TP53*. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση των επιπέδων *Cdt1* σχετίζεται με την αυξημένη συχνότητα γονιδιακής

ενίσχυσης μόνο σε ασθενείς με λειτουργικό (wt) TP53. Αντιθέτως η συσχέτιση μεταξύ γονιδιακής ενίσχυσης και επιπέδων Cdc6 δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την κατάσταση του γονιδίου TP53 (εικόνα 4.34).



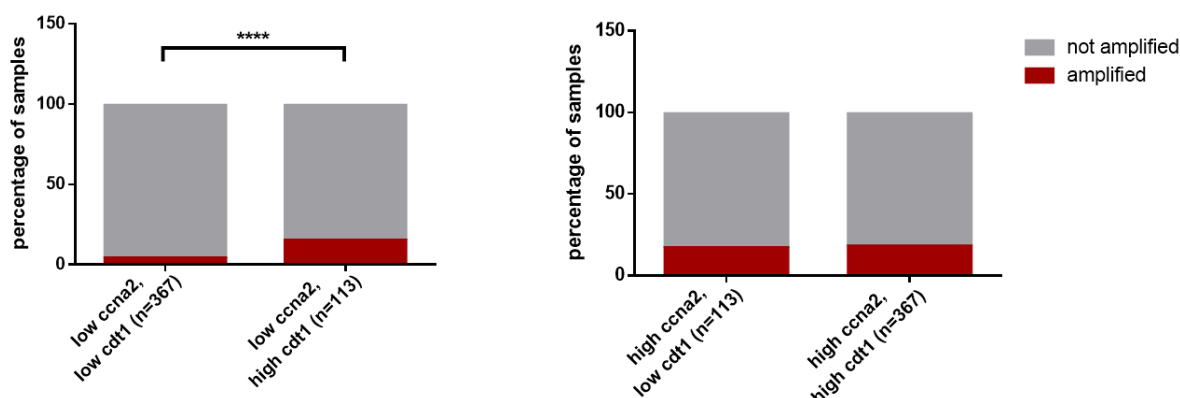
Εικόνα 4.34 Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης Cdt1 και Cdc6 με την γονιδιακή ενίσχυση σε ασθενείς με φυσιολογικό ή μη TP53. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ισομεγέθεις ομάδες με βάση την έκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 και ακολουθήσε περαιτέρω ομαδοποίηση με βάση την κατάσταση του γονιδίου TP53 (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένο). Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την κατανομή των amplification score των δειγμάτων κάθε υποομάδας. Η θετική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης παρατηρείται μόνο σε ασθενείς με λειτουργικό TP53 (αριστερά). Αντίθετα, τα αυξημένα επίπεδα του Cdc6 σχετίζονται με γονιδιακή ενίσχυση ανεξάρτητα από την κατάσταση του TP53 (δεξιά). Η σύγκριση των κατανομών κάθε υποκατηγορίας έγινε με δοκιμή Mann-Whitney.

4.2.1.6 Η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης του ERBB2 παρατηρείται σε δείγματα με χαμηλή έκφραση της κυκλίνης A

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης του ERBB2 επηρεάζεται από τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης A2. Η κυκλίνη A2 (Ccn2) παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S και από την G2 στην M. Αποτελεί προγνωστικό δείκτη, ενώ η υπερέκφρασή της έχει παρατηρηθεί σε δεκάδες τύπους καρκίνου τονίζοντας τη σημασία του ρόλου της στην καρκινική εξαλλαγή και την

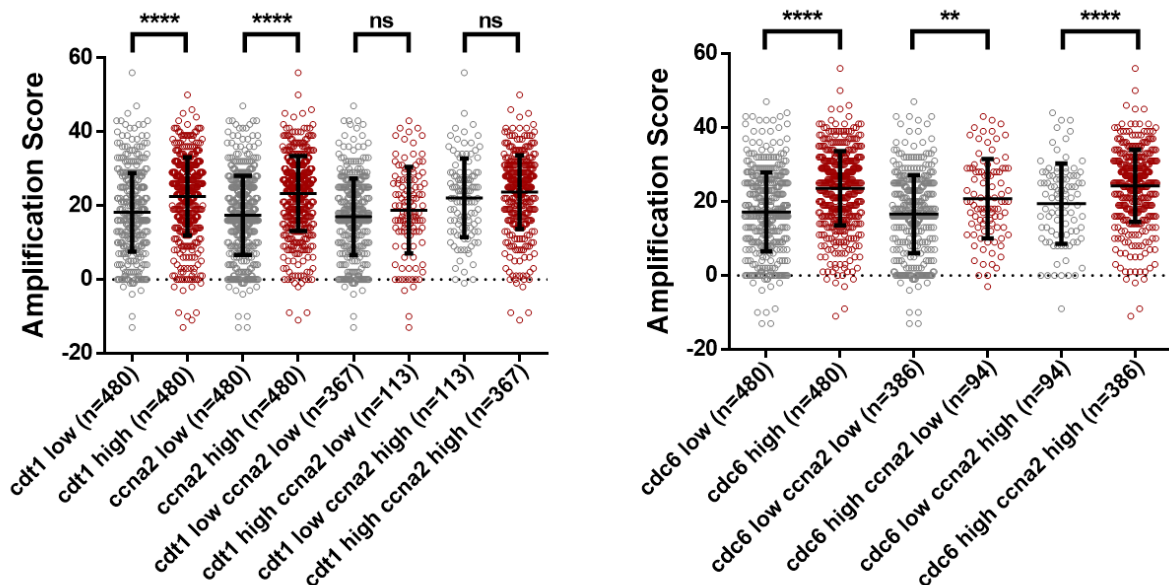
εξέλιξη της νόσου [196]. Επιπλέον, η κυκλίνη A φαίνεται να παίζει ρόλο στην αδειοδότηση μέσω της αρνητικής ρύθμισης των επιπέδων των παραγόντων Cdt1 και Cdc6. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση του Cdt1 από την κυκλίνη A αποτελεί απαραίτητο βήμα για την αναγνώριση του αδειοδοτικού παράγοντα από το σύμπλοκο SCF-Skp2, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην αποικοδόμηση του [85, 197]. Ο παράγοντας Cdc6 αποτελεί επίσης υπόστρωμα για φωσφορυλίωση από το σύμπλοκο κυκλίνης a και CDK2. Η φωσφορυλίωση του Cdc6 από το σύμπλοκο αυτό οδηγεί στην έξοδο του Cdc6 στο κυτταρόπλασμα και την αποικοδόμησή του [198].

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα επίπεδα της έκφρασης της κυκλίνης A επηρεάζουν τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του παράγοντα Cdt1 και της ενίσχυσης του γενετικού τόπου ERBB2, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα ασθενών με καρκίνου του μαστού. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ισομεγέθεις ομάδες με βάση την έκφραση του παράγοντα Cdt1. Ως δείγματα χαμηλής έκφρασης (low) χαρακτηρίστηκαν εκείνα που είχαν τιμές έκφρασης Cdt1 χαμηλότερες από τη διάμεσο, ενώ αντίστοιχα τα δείγματα με υψηλότερες τιμές χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης (high). Ομοίως, στη συνέχεια οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση την έκφραση του παράγοντα Ccna2. Σε κάθε υποκατηγορία που δημιουργήθηκε, μετρήθηκε ο αριθμός των δειγμάτων που εμφανίζουν ενίσχυση στον γενετικό τόπο ERBB2 (GISTIC score =2). Τέλος, ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των υποκατηγοριών και στατιστική ανάλυση με τη δοκιμή χ^2 . Παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα που εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα Ccna2, η έκφραση του παράγοντα Cdt1 σχετίζεται θετικά με τη γονιδιακή ενίσχυση του γονιδίου ERBB2. Αντίθετα, στους ασθενείς με υψηλά επίπεδα Ccna2 δεν παρατηρήθηκε καμία τέτοια συσχέτιση (εικόνα 4.35).



Εικόνα 4.35 Υψηλά επίπεδα mRNA του παραγόντων Cdt1 σχετίζονται θετικά με την ενίσχυση του γονιδίου ERBB2 μόνο σε δείγματα ασθενών με χαμηλά επίπεδα της κυκλίνης A. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ισομεγέθεις ομάδες με βάση την έκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα Cdt1 και ακολουθήσε περαιτέρω ομαδοποίηση σε δύο ομάδες με βάση την έκφραση της κυκλίνης A2 (ccna2). Σε κάθε κατηγορία προσδιορίστηκε ο αριθμός των δειγμάτων με ενίσχυση στο γενετικό τόπου ERBB2 (GISTIC score=2). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμή χ^2 .

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Cdt1 ή του Cdc6 και της συνολικής γονιδιακής ενίσχυσης σε ασθενείς με χαμηλή και υψηλή έκφραση του Ccna2. Για το σκοπό αυτό υπολογίστηκε το total amplification score των δειγμάτων καθώς και οι κατανομές τους για κάθε υποκατηγορία ασθενών. Η σύγκριση των κατανομών πραγματοποιήθηκε με δοκιμασία Mann-Whitney. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι μεμονωμένα, η έκφραση της κυκλίνης A2 σχετίζεται θετικά με την αυξημένη συνολική γονιδιακή ενίσχυση. Επιπλέον, στα δείγματα ασθενών τόσο με χαμηλή όσο και υψηλή έκφραση Ccna2, η αύξηση της έκφρασης του Cdc6 συσχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων γονιδιακής ενίσχυσης, ενώ αντίστοιχη στατιστικά σημαντική συσχέτιση δε βρέθηκε με την έκφραση του Cdt1 (εικόνα 4.36).



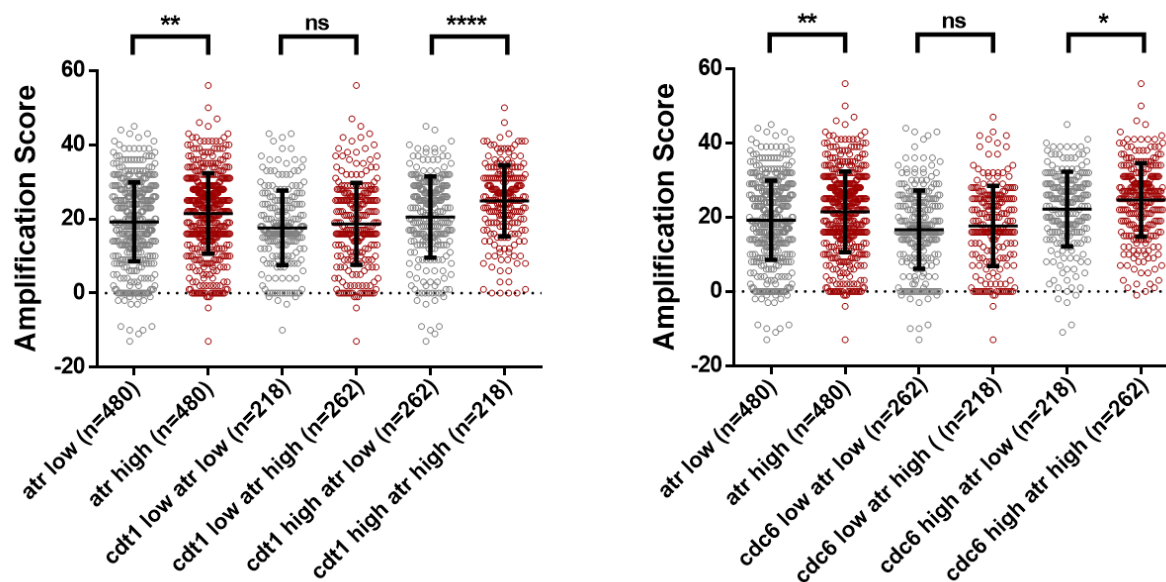
Εικόνα 4.36 Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης *Cdt1* και *Cdc6* με την γονιδιακή ενίσχυση σε ασθενείς με χαμηλή και υψηλή έκφραση της κυκλίνης A2. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ισομεγέθεις ομάδες με βάση την έκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6* και ακολουθήσε περαιτέρω ομαδοποίηση με βάση την έκφραση της κυκλίνης A2. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την κατανομή των *amplification score* των δειγμάτων κάθε υποομάδας. Η σύγκριση των κατανομών κάθε υποκατηγορίας έγινε με δοκιμή Mann-Whitney.

Παρατηρούμε λοιπόν, ότι σε επίπεδο συνολικής γονιδιακής ενίσχυσης η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του *Cdc6* και γονιδιακής ενίσχυσης δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα της κυκλίνης A2. Αντίθετα, στην περίπτωση του παράγοντα *Cdt1* φαίνεται πως η συσχέτιση της έκφρασης του *Cdt1* με τη γονιδιακή ενίσχυση επηρεάζεται από τα επίπεδα της κυκλίνης A2, γεγονός που ενδέχεται να σχετίζεται με την άμεση ρύθμιση του *Cdt1* από την κυκλίνη A σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

4.2.2 Μελέτη του ρόλου των μηχανισμών ανίχνευσης βλάβης στην γονιδιακή ενίσχυση παρουσία επαναντιγραφής

Γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι οι ασταθείς δομές που δημιουργούνται από την επαναπυροδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής, προκαλούν βλάβες στο DNA οι οποίες ενεργοποιούν ATR-εξαρτώμενα σημεία ελέγχου κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου [108]. Με βάση αυτήν την πληροφορία θελήσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο της ATR στην γονιδιακή ενίσχυση που σχετίζεται με την

έκφραση των Cdt1 και Cdc6 σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες με βάση την έκφραση του παράγοντα Cdt1 ή του Cdc6, ενώ ακολούθησε υποκατηγοριοποίηση με βάση την έκφραση του ATR. Για κάθε μία από τις υποκατηγορίες υπολογίστηκαν οι κατανομές των amplification score, ενώ η σύγκριση των κατανομών έγινε με τη δοκιμή Mann-Whitney.

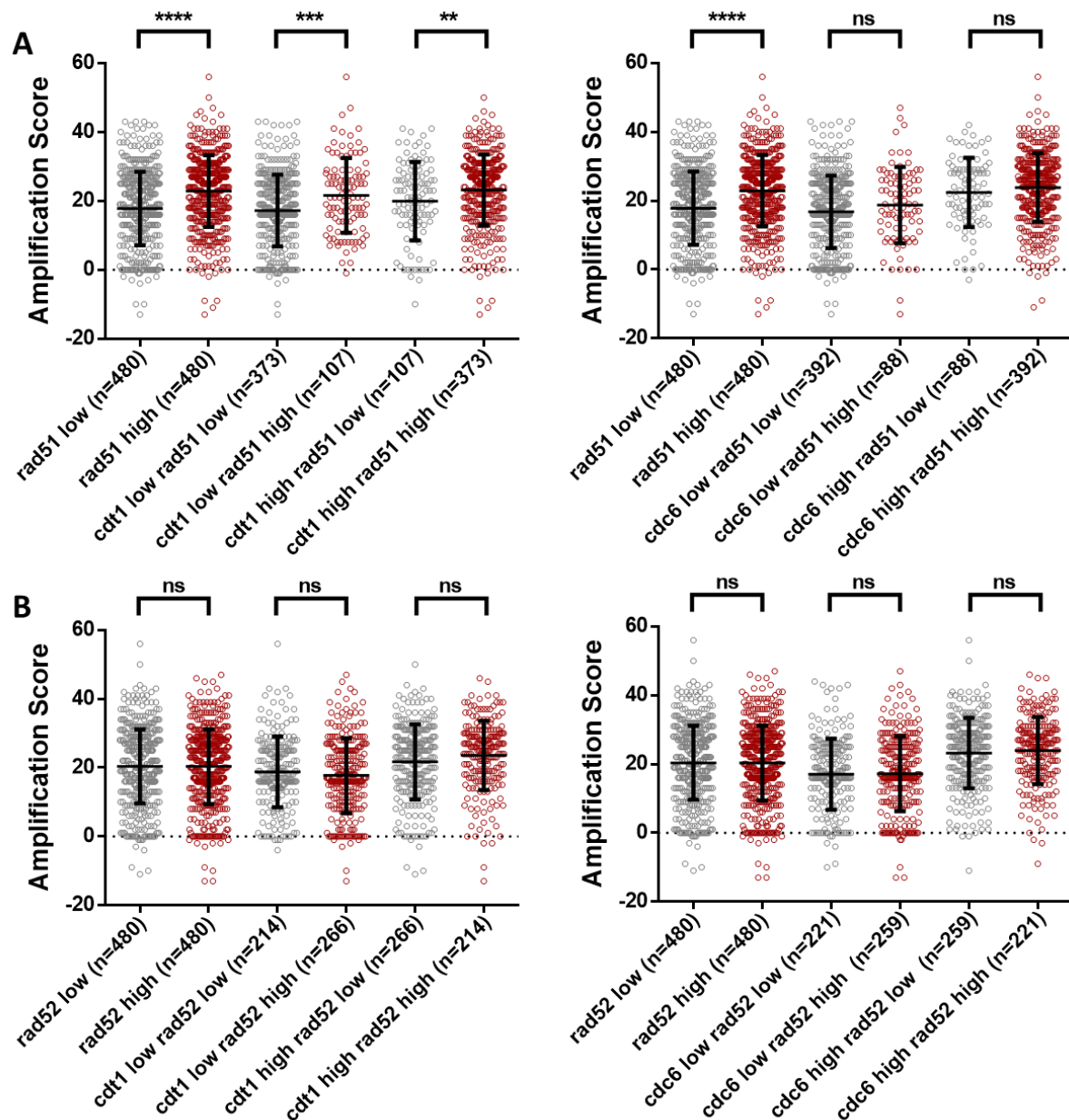


Εικόνα 4.37 Η έκφραση του γονιδίου ATR σχετίζεται θετικά με την γονιδιακή ενίσχυση σε δείγματα ασθενών με αυξημένα επίπεδα των παραγόντων Cdt1 και Cdc6. Ασθενείς με καρκίνο του μαστού ομαδοποιήθηκαν με βάση τις εκφράσεις των γονιδίων ATR, CDC6 και CDT1, για κάθε υποκατηγορία υπολογίστηκαν οι κατανομές των amplification scores. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την κατανομή των amplification score των δειγμάτων κάθε υποομάδας. Η σύγκριση των κατανομών έγινε με τη δοκιμή Mann-Whitney.

Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του ATR σχετίζεται θετικά (P value=0.0012) με την γονιδιακή ενίσχυση στους ασθενείς αυτούς (εικόνα 4.37). Περαιτέρω κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την έκφραση του ATR αλλά και των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 έδειξε ότι η θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων έκφρασης του ATR και της γονιδιακής ενίσχυσης εμφανίζεται αποκλειστικά στα δείγματα που έχουν αυξημένη έκφραση είτε του Cdt1 είτε του Cdc6.

4.2.3 Μελέτη του ρόλου των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στη γονιδιακή ενίσχυση παρουσία επαναντιγραφής

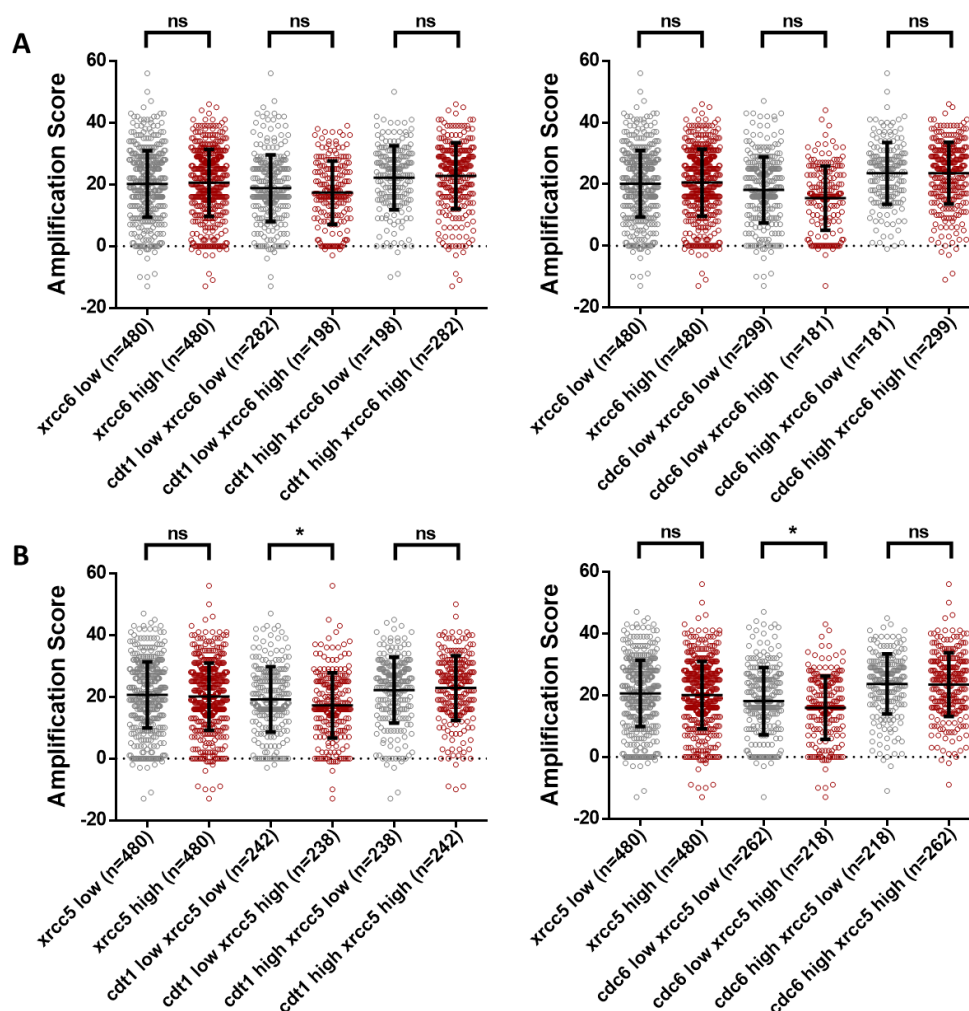
Η επαναντιγραφή του DNA προκαλεί τη δημιουργία ασταθών δομών οδηγώντας τελικά σε σταμάτημα των διχαλών αντιγραφής και τη δημιουργία θραύσεων στο DNA. Οι θραύσεις αυτές ενεργοποιούν μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Παράλληλες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η επιδιόρθωση των περιοχών που επαναντιγράφονται μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση αυτών (διδακτορική διατριβή Πετρόπουλου Μιχάλη). Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ένας από τους μηχανισμούς που προτάθηκε ότι παίρνει μέρος στην ενίσχυση γονιδίων κατά την επαναντιγραφή, τόσο σε κύτταρα *S.cerevisiae* όσο και θηλαστικών [137, 199]. Προκειμένου να διερευνήσουμε αν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης σχετίζονται με τη γονιδιακή ενίσχυση παρουσία επαναντιγραφής στον καρκίνο του μαστού χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα έκφρασης της TCGA για τα γονίδια RAD51 και RAD52 τα οποία παίζουν ρόλο στον ομόλογο ανασυνδυασμό και τα γονίδια XRCC5 (Ku80) και XRCC6 (Ku70) που παίρνουν μέρος στα πρώτα βήματα τη μη ομόλογης ένωσης άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ). Οι ασθενείς χωρίστηκαν και πάλι σε 2 ομάδες με βάση την έκφραση καθενός από τους παραπάνω παράγοντες ενώ ακολούθησε υποκατηγοριοποίηση με βάση την έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6. Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι κατανομές των amplification score για κάθε υποκατηγορία, ενώ η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney.



Εικόνα 4.38 Συσχέτιση έκφρασης παραγόντων ομόλογου ανασυνδυασμού και γονιδιακής ενίσχυσης. Ασθενείς με καρκίνο του μαστού ομαδοποιήθηκαν με βάση τις εκφράσεις των γονιδίων RAD51, RAD52, CDC6 και CDT1, για κάθε υποκατηγορία υπολογίστηκαν οι κατανομές των amplification scores. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την κατανομή των amplification score των δειγμάτων κάθε υποομάδας. Η σύγκριση των κατανομών έγινε με τη δοκιμή Mann-Whitney.

Αρχικά, μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Rad51 και Rad52 και της γονιδιακής ενίσχυσης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που παρουσίαζαν υψηλή έκφραση Rad51 είχαν και αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης (εικόνα 4.38 Α). Περαιτέρω

κατηγοριοποίηση με βάση τα επίπεδα των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 έδειξε ότι η συσχέτιση αυτή είναι ανεξάρτητη από την έκφρασή τους. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι τόσο στα δείγματα ασθενών με χαμηλά όσο και υψηλά επίπεδα Cdt1 η θετική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Rad51 και γονιδιακής ενίσχυσης παραμένει στατιστικά σημαντική, ενώ αντίθετα στους ασθενείς με χαμηλά ή υψηλά επίπεδα Cdc6 δεν εμφανίζεται συσχέτιση. Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τον παράγοντα Rad52 (εικόνα 4.38 B) που επίσης συμμετέχει στον μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού. Σε αυτήν την περίπτωση δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του Rad52 και της γονιδιακής ενίσχυσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η συσχέτιση αυτή δεν υφίσταται ούτε στην κατηγορία δειγμάτων με χαμηλά ή υψηλά επίπεδα των παραγόντων Cdt1 και Cdc6.



Εικόνα 4.39 Συσχέτιση έκφρασης παραγόντων μη ομόλογης ένωσης άκρων και γονιδιακής ενίσχυσης. Ασθενείς με καρκίνο του μαστού ομαδοποιήθηκαν με βάση τις εκφράσεις των γονιδίων XRCC6, XRCC5, CDC6 και CDT1, για κάθε υποκατηγορία υπολογίστηκαν οι κατανομές των amplification scores. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την κατανομή των amplification score των δειγμάτων κάθε υποομάδας. Η σύγκριση των κατανομών έγινε με τη δοκιμή Mann-Whitney.

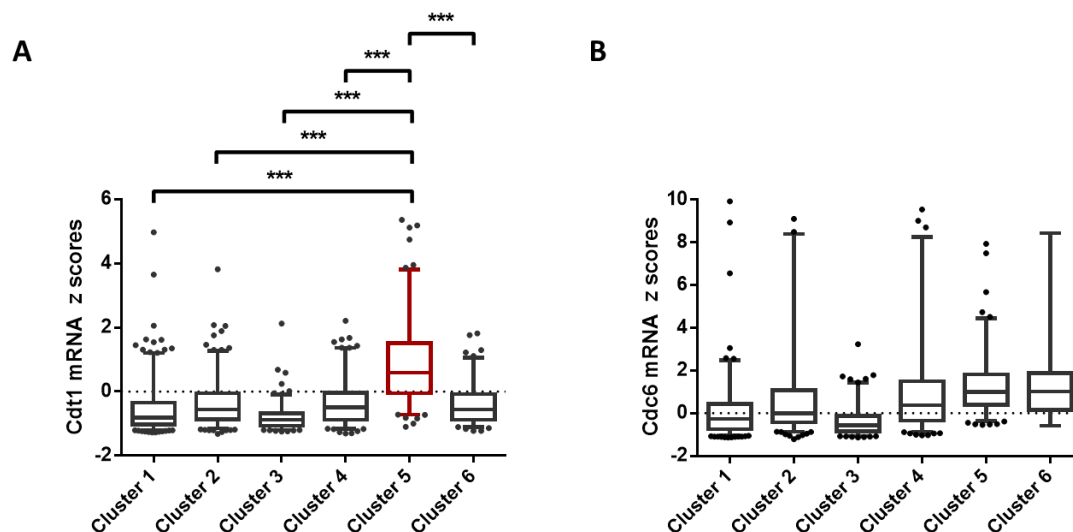
Τέλος μελετήθηκε η πιθανή συμβολή του μηχανισμού της μη ομόλογης ένωσης άκρων στην γονιδιακή ενίσχυση που συμβαίνει παρουσία υψηλών επιπέδων Cdt1 και Cdc6. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της έκφρασης τόσο του XRCC6 όσο και του XRCC5 δεν συνεπάγεται αλλαγές στα επίπεδα της γονιδιακής ενίσχυσης (εικόνα 4.39). Επιπλέον, η υποκατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την έκφραση των Cdt1 και Cdc6 υπέδειξε την απουσία θετικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των XRCC5/6 και γονιδιακής ενίσχυσης στα δείγματα που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα Cdt1 και Cdc6.

4.2.4 Μελέτη προτύπων γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού

Είδαμε ότι σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού η αυξημένη έκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 συσχετίζεται σημαντικά τόσο με την ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών τόπων, όσο και με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος. Ωστόσο, η ανάλυση αυτή δε λαμβάνει υπόψη το πως κατανέμονται οι περιοχές που υφίστανται ενίσχυση στο γονιδίωμα, καθώς και αν η κατανομή τους διαφοροποιείται ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των Cdt1 και Cdc6. Για το σκοπό αυτό, έγινε προσπάθεια ομαδοποίησης των ασθενών με βάση τα πρότυπα γονιδιακής ενίσχυσης που εμφανίζουν και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των Cdt1 και Cdc6 μεταξύ των ομάδων.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τον αριθμό αντιγράφων κατά μήκος του γονιδιώματος είναι διαθέσιμα μέσω της πλατφόρμας του cBioPortal σε μορφή αρχείου seg (segmentation file). Αρχικά υπολογίστηκε το ιεραρχικό δέντρο που απεικονίζει το σύνολο των ασθενών οργανωμένων σύμφωνα με την ομοιότητά τους ως προς το πρότυπο γονιδιακής ενίσχυσης. Με βάση αυτό ακολούθησε ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών σε έξι ομάδες (clusters), ενώ για κάθε ασθενή βρέθηκαν οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες εκφράσεις (mRNA z scores) των παραγόντων Cdt1 και Cdc6. Η εικόνα 4.40 περιλαμβάνει τις κατανομές των εκφράσεων των Cdt1 (A) και Cdc6 (B) στις 6 διαφορετικές ομάδες ασθενών. Παρατηρώντας τις κατανομές έκφρασης του Cdt1, παρατηρήθηκε ότι η ομάδα 5 διαφοροποιείται σε σχέση με τις υπόλοιπες καθώς περιλαμβάνει ασθενείς με αυξημένη έκφραση του παράγοντα. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η κατανομή της ομάδας 5 διαφέρει από των υπολοίπων ομάδων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των διακυμάνσεων των κατανομών με τη δοκιμή Levene. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η κατανομή της ομάδας 5 διαφοροποιείται

σημαντικά από τις υπόλοιπες. Αντιθέτως, στην περίπτωση του παράγοντα Cdc6 δεν παρατηρήθηκε κάποια ομάδα που να διαφοροποιείται.



Εικόνα 4.40 Έκφραση αδειοδοτικών παραγόντων στις διαφορετικές ομάδες ασθενών με καρκίνο του μαστού. Πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών σε έξι ομάδες (clusters) με βάση τα πρότυπα γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος τους με τη. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι κατανομές της έκφρασης των παραγόντων Cdt1 (αριστερά) και Cdc6 (δεξιά) και για τις 6 ομάδες ασθενών. Η σύγκριση των κατανομών έγινε με τη δοκιμή Levene.

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης των καρκίνων δειγμάτων συμπεραίνουμε ότι η αυξημένη έκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης τόσο σε μεμονωμένους γενετικούς τόπους όσο και κατά μήκος του γονιδιώματος. Αντίστοιχη συσχέτιση διαπιστώθηκε και σε άλλους τύπους καρκίνου. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Cdt1/Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης είναι ανεξάρτητη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων. Επιπλέον, η συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης παρατηρήθηκε μόνο σε δείγματα που φέρουν λειτουργικό τον παράγοντα p53, ενώ αντίστοιχα η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης είναι ανεξάρτητη της κατάστασης του p53. Η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του Cdt1 και Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης φαίνεται επίσης ότι δεν επηρεάζεται από την έκφραση παραγόντων που συμμετέχουν στα δύο κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA, τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Rad51, Rad52) και τη μη ομόλογη ένωση άκρων (Xrcc5, Xrcc6). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα Cdt1 εμφανίζουν συγκεκριμένα πρότυπα ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος, ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να ταυτοποιηθούν.

5. Συζήτηση

5.1 Μελέτη της επαναντιγραφής του DNA στον *S.pombe*

Η ενορχήστρωση της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εξασφάλιση της πλήρους αντιγραφής ολόκληρου το γονιδιώματος μια και μόνο φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη ρύθμιση παίζει η διαδικασία της αδειοδότησης της αντιγραφής η οποία καθορίζει τις θέσεις πάνω στο γονιδίωμα από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής, ενώ με τη βοήθεια πρόσθετων μηχανισμών αποτρέπει την επαναχρησιμοποίηση των ίδιων αφετηριών στον ίδιο κυτταρικό κύκλο. Η ρύθμιση των επιπέδων των αδειοδοτικών παραγόντων Cdc6/Cdc18 και Cdt1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου κατέχει σημαντικό ρόλο στη σωστή ρύθμιση της έναρξης της αντιγραφής. Υψηλά επίπεδα έκφρασης των παραγόντων αυτών έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση επαναντιγραφής και γονιδιωματική αστάθεια τόσο σε μύκητες όσο και σε μετάρζωα.

Στον *S.pombe*, υψηλά επίπεδα έκφρασης του παράγοντα Cdc18 (ομόλογο του Cdc6) οδηγεί σε επαναχρησιμοποίηση των ίδιων αφετηριών προκαλώντας επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιγραφής μέσα στην ίδια φάση S. Τα κύτταρα αποκτούν υψηλό περιεχόμενο DNA που φτάνει έως 8-16C [89], ενώ ταυτόχρονη υπερέκφραση του παράγοντα Cdt1 επιφέρει ακόμα μεγαλύτερη αύξηση έως και 32C [90-92]. Η επαναντιγραφή του γονιδιώματος δεν είναι ομοιόμορφη. Συγκεκριμένες περιοχές των οποίων τα επίπεδα επαναντιγραφής ξεπερνούν κατά πολύ το μέσο όρο του γονιδιώματος [93].

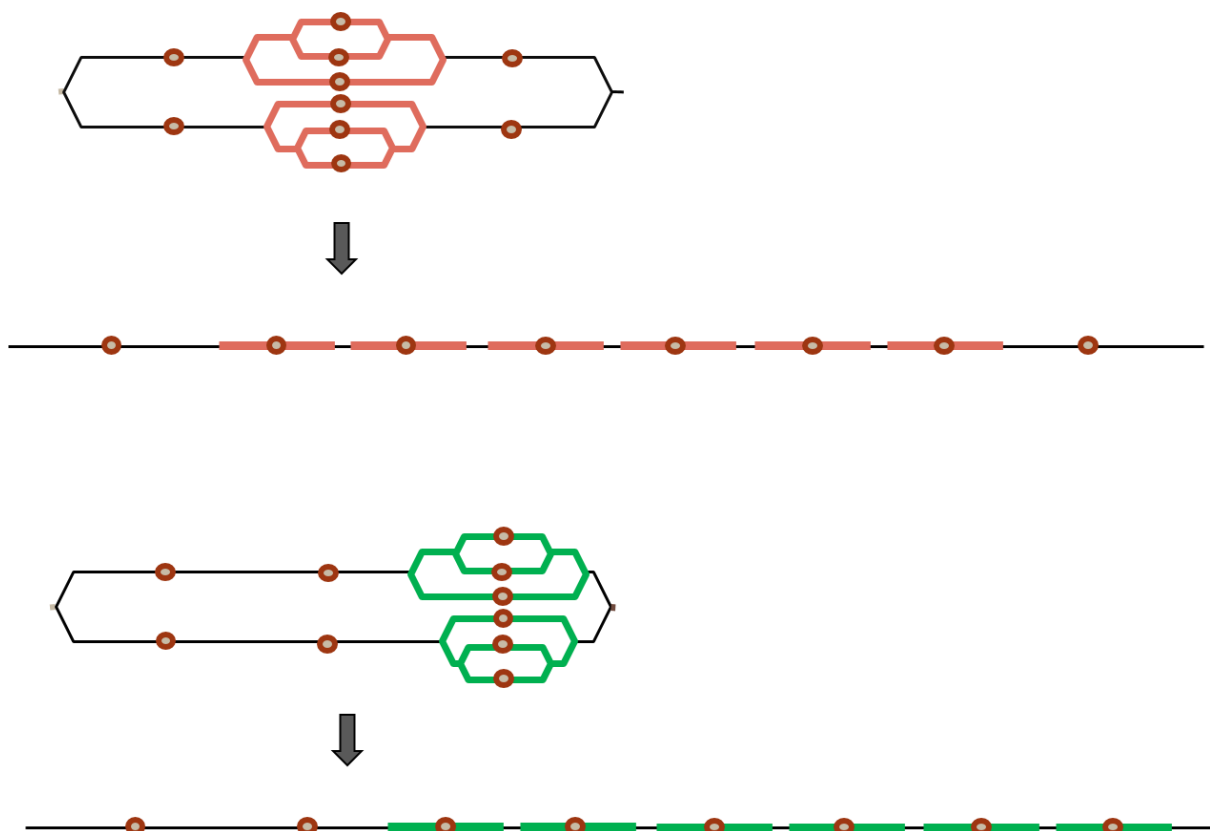
5.1.1 Μελέτη επαναντιγραφής του DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων *S.pombe*

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου οδήγησαν στη δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου που προσομοιάζει την επαναντιγραφή του γονιδιώματος του *S.pombe* (Διδακτορική διατριβή Μαριάννας Ραψομανίκης). Το μοντέλο της επαναντιγραφής αποτελεί ένα γραμμικό μοντέλο (δε λαμβάνει υπόψη την κατανομή του γονιδιώματος

στον τρισδιάστατο χώρο) και προσομοιάζει τη διαδικασία αντιγραφής στον *S.pombe* επιτρέποντας την επαναπυροδότηση των αφετηριών. Το μοντέλο αυτό δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης του φαινομένου της επαναντιγραφής τόσο σε επίπεδο κυττάρου, εφόσον κάθε προσομοίωση αντιστοιχεί σε ένα κύτταρο, όσο και σε επίπεδο πληθυσμού όπου λαμβάνεται υπόψη ο μέσος όρος πολλαπλών προσομοιώσεων.

Η ανάλυση των *in silico* δεδομένων του μοντέλου επαναντιγραφής έδειξε ότι σε επίπεδο πληθυσμού κυττάρων η επαναντιγραφή εμφανίζεται σταθερή καθώς οι περιοχές του γονιδιώματος που ενισχύονται παραμένουν ίδιες. Ωστόσο αυτό δεν συμβαίνει και σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων όπου παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια ως προς τα προφίλ επαναντιγραφής κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Η ετερογένεια του φαινομένου σε επίπεδο κυττάρων επιβεβαιώθηκε και πειραματικά χρησιμοποιώντας κύτταρα *S.pombe*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη στα οποία έγινε σήμανση των γονιδίων *lys1+* και *ade3+* με το σύστημα LacO-LacI. Η οπτικοποίηση των κυττάρων και των σημειωμένων περιοχών έγινε με μικροσκόπιο φθορισμού, ενώ ο προσδιορισμός των επιπέδων επαναντιγραφής των περιοχών αυτών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση εικόνας. Οι περιοχές των γονιδίων *lys1+* και *ade3+* διαφέρουν ως προς την απόδοση των αφετηριών που τις περιβάλλουν. Το γονίδιο *lys1+* βρίσκεται ανάμεσα σε δύο πολύ αποδοτικές αφετηρίες και η περιοχή αυτή τείνει να εμφανίζεται υπερ-ενισχυμένη σε επίπεδο πληθυσμού. Αντιθέτως το γονίδιο *ade3+* πλαισιώνεται από μη αποδοτικές αφετηρίες και τα επίπεδα επαναντιγραφής του σε επίπεδο πληθυσμού είναι χαμηλότερα σε σχέση με το μέσο όρο του γονιδιώματος. Και στις δύο περιπτώσεις, η ποσοτικοποίηση της χρωστικής Hoechst επιβεβαίωσε ότι τα κύτταρα προχωρούν σε επαναντιγραφή, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε ετερογένεια ως προς τα επίπεδα επαναντιγραφής των δύο περιοχών, η οποία προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές μετρικές.

Συγκεντρωτικά είδαμε αν και σε επίπεδο πληθυσμού οι περιοχές που ενισχύονται παραμένουν οι ίδιες σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων υπάρχει ετερογένεια ως προς τις περιοχές που υπερ-ενισχύονται κάθε φορά. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να αποτελέσει βασικό μηχανισμό της εξέλιξης του γονιδιώματος καθώς φαίνεται να οδηγεί σε γονιδιακή πλαστικότητα. Έχει προταθεί πως η επαναντιγραφή μπορεί να οδηγήσει σε ενσωμάτωση των ενισχυμένων περιοχών στο γονιδίωμα μέσω μηχανισμών όπως ο ανασυνδυασμός. Σε συνδυασμό με την ετερογένεια των περιοχών που ενισχύονται, φαίνεται πως η επαναντιγραφή μπορεί να αποτελέσει μια εξελικτική διαδικασία κατά την οποία δημιουργούνται πολλαπλοί νέοι γονότυποι.



Εικόνα 5.1 Η ετερογένεια της επαναντιγραφής σε επίπεδο κυττάρων οδηγεί σε διαφορετικούς γονοτύπους, έπειτα από ενσωμάτωση των ενισχυμένων περιοχών στο γονιδίωμα.

Εκτός από την ανάλυση συγκεκριμένων γενετικών τόπων έγινε προσπάθεια μελέτης της ετερογένειας της επαναντιγραφής κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων. Η ανάπτυξη τεχνικών που επιτρέπουν την αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) μεμονωμένων κυττάρων επιτρέπει την ανάλυση των προφίλ επαναντιγραφής αυτών. Ωστόσο η εφαρμογή των τεχνικών αυτών στον *S.pombe* αποτελεί μεγάλη πρόκληση. Η διαδικασία περιλαμβάνει την καλλιέργεια των κυττάρων και την ενζυμική λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων με τη χρήση ειδικού κυτταροδιαχωριστή και η λύση των κυττάρων προκειμένου να απελευθερωθεί το γονιδίωμά τους. Τέλος, πραγματοποιείται ενίσχυση του γονιδιώματος των κυττάρων με τη χρήση μεθοδολογιών ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος (Whole Genome Amplification), έτσι ώστε να παραχθεί επαρκής ποσότητα DNA προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία της αλληλούχισης.

Υπάρχουν τρεις βασικές προσεγγίσεις για την ενίσχυση πλήρους γονιδιώματος από μεμονωμένα κύτταρα: α) μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), β) μέθοδοι που πραγματοποιούν ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλών μεταθέσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA) και γ) η μέθοδος Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycle (MALBAC). Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία εμπίπτουν στις δύο πρώτες κατηγορίες.

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα που παρατηρήθηκαν κατά την αλληλούχιση γονιδιωμάτων από μεμονωμένα κύτταρα *S.pombe* ήταν η ύπαρξη μολύνσεων. Η καλλιέργεια των κυττάρων του *S.pombe* αλλά και ο διαχωρισμός μεμονωμένων κυττάρων θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ειδικό χώρο αποκλειστικά για τον *S.pombe*, για την αποφυγή μολύνσεων από εξωγενείς παράγοντες. Το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του *S.pombe* αποτελεί ένα επιπλέον πρόβλημα. Ένα ανθρώπινο κύτταρο διαθέτει γονιδίωμα μεγέθους ~6.400 Mb, ενώ ένα κύτταρο *S.pombe* μόλις 12,57 Mb. Σε περίπτωση μόλυνσης του δείγματος από ανθρώπινο DNA, κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης πλήρους γονιδιώματος, το ανθρώπινο DNA είναι αυτό που θα ενισχυθεί τελικά, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει επαρκής ποσότητα DNA του *S.pombe* ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία της αλληλούχισης. Πιθανή αιτία μόλυνσης των δειγμάτων φαίνεται να αποτελεί και η διαδικασία διαχωρισμού μεμονωμένων κυττάρων με τη χρήση κυτταροδιαχωριστή. Στην περίπτωση αυτή υπάρχουν εναλλακτικές διαδικασίες για το διαχωρισμό των κυττάρων όπως η πραγματοποίηση διαδοχικών αραιώσεων των καλλιεργειών, είτε η χρήση ειδικών συσκευών μικρορευστομηχανικής (microfluidics).

Η ύπαρξη μολύνσεων από ανθρώπινο DNA επέτρεψε τη αξιολόγηση μόνο του REPLI-g Single-cell WGA (Qiagen) το οποίο βασίζεται στη ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλών μεταθέσεων. Κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής παρατηρήθηκε έλλειψη ομοιομορφίας στην ενίσχυση των γονιδιωμάτων από μεμονωμένα κύτταρα. Η μέθοδος της ισοθερμικής ενίσχυσης πολλαπλών εκτοπίσεων (MDA) αλλά και οι μέθοδοι ενίσχυσης που βασίζονται στην PCR επιτρέπουν την μεροληπτικότητα κατά την ενίσχυση του γονιδιώματος. Εναλλακτική μέθοδο ενίσχυσης αποτελεί η μεθοδολογία MALBAC (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles), η οποία μειώνει το σφάλμα που εξαρτάται από την αλληλουχία και το οποίο επιδεινώνεται από την εκθετική ενίσχυση. Η εφαρμογή ενός πιο αποδοτικού τρόπου για το διαχωρισμό των κυττάρων, με σκοπό τη μείωση των μολύνσεων και της

μεθοδολογίας MALBAC για την ενίσχυση γονιδιωμάτων ενδεχομένως να συνέβαλε αρκετά στην ομοιόμορφη ενίσχυση του γονιδιώματος μεμονωμένων κυττάρων *S.pombe* επιτρέποντας την αλληλούχιση τους και τη βαθύτερη μελέτη του φαινομένου της επαναντιγραφής.

Η ανάλυση των προφίλ επαναντιγραφής σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων μπορεί να αναδείξει την ύπαρξη διαφορετικών ομάδων κυττάρων που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά γονιδιωματικά πρότυπα, καθώς επίσης προσφέρει τη δυνατότητα διερεύνησης αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών περιοχών, όπου η ενίσχυση ενός τόπου μπορεί να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την ενίσχυση μίας απομακρυσμένης περιοχής του γονιδιώματος.

5.1.2 Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της επαναντιγραφής των τελομερών

Η ανάλυση των *in silico* δεδομένων σε επίπεδο πληθυσμού επιβεβαίωσε ότι η επαναντιγραφή του DNA είναι ανομοιόμορφη κατά μήκος του γονιδιώματος, ενώ η σύγκριση με υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα έδειξε ότι οι προσομοιώσεις αναπαράγουν σε μεγάλο βαθμό το προφίλ επαναντιγραφής με ορισμένες διαφοροποιήσεις. Οι αποκλίσεις των *in silico* δεδομένων εντοπίστηκαν κυρίως στην περιοχή των τελομερών των οποίων ο αριθμός αντιγράφων εμφανίζεται πολύ χαμηλότερος σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένα. Η διαφοροποίηση αυτή ενδεχομένως οφείλεται στην ύπαρξη ενός μηχανισμού που ρυθμίζει την πυροδότηση των αφετηριών συγκεκριμένα στην περιοχή γύρω από τα τελομερή. Υποθέτουμε λοιπόν ότι υπάρχει ένας παράγοντας ο οποίος φυσιολογικά καταστέλλει την πυροδότηση των αφετηριών και βρίσκεται σε περιορισμένη συγκέντρωση. Κατά την επαγωγή της επαναντιγραφής και καθώς τα αντίγραφα των τελομερών αυξάνονται, τα επίπεδα του παράγοντα αυτού δε θα επαρκούν για την καταστολή των θέσεων έναρξης με αποτέλεσμα την αυξημένη επαναπυροδότησή τους.

Η έναρξη της αντιγραφής στις αφετηρίες που βρίσκονται στις υποτελομερικές περιοχές ρυθμίζεται μέσω δύο βασικών παραγόντων, του Rif1 και του Taz1. Οι περιοχές αυτές διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για το Taz1, το οποίο στη συνέχεια στρατολογεί το Rif1 το οποίο δρα ανασταλτικά εμποδίζοντας την πυροδότηση των παρακείμενων αφετηριών. Σύμφωνα με αυτά, οι παράγοντες Taz1 και Rif1 θα

μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους περιοριστικούς παράγοντες που θα εξηγούσαν την απόκλιση που παρατηρήθηκε μεταξύ προσομοιώσεων και πειραματικών δεδομένων. Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη υπερέκφραση του Cdc18 και του Rif1 ή του Taz1. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε φέρει το γονίδιο *cdc18* υπό τον έλεγχο του *nmt1* και υπόκειται σε έντονη επαναντιγραφή, ενώ για την υπερέκφραση τόσο του Rif1 όσο και του Taz1 χρησιμοποιήθηκε ο φορέας υπερέκφρασης pDUAL2 ο οποίος επίσης φέρει *nmt1* υποκινητή. Έπειτα από 23 ώρες επαγωγής, διαπιστώθηκε η επίτευξη της επαναντιγραφής με κυτταρομετρία ροής, ενώ έγινε σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων επαναντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών των χρωμοσωμάτων I και II με real-time qPCR.

Η υπερέκφραση του παράγοντα Rif1 φαίνεται να επηρεάζει τη φυσιολογία των κυττάρων και πιθανά να προκαλεί τοξικότητα, εφόσον παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα έπειτα από ταυτόχρονη υπερέκφραση των παραγόντων Rif1 και Cdc18 δεν προχωρούν σε τόσο έντονη επαναντιγραφή ενώ αποκτούν ασυνήθιστη στρογγυλή μορφολογία με διογκωμένους πυρήνες και όχι το επίμηκες σχήμα που χαρακτηρίζει τα κύτταρα που πραγματοποιούν επαναντιγραφή (εικόνα 4.19).

Η Tel1 κινάση αποτελεί ομόλογη της ATM και παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του μήκους των τελομερών στον *S. cerevisiae*. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι σε τελομερή μικρού μήκους η Tel1 προσδένεται άμεσα σε αυτά και φωσφορυλιώνει τον παράγοντα Rif1. Η φωσφορυλίωση αυτή δεν επαρκεί ωστόσο για την καταστολή της δράσης του Rif1. Επιπλέον η πρόσδεση της Tel1 στα τελομερή οδηγεί στην πρόσδεση του παράγοντα Cdc45 προάγοντας έτσι την πρώιμη πυροδότηση των αφετηριών που βρίσκονται στις υποτελομερικές περιοχές. Στον *S.pombe* η απαλοιφή του γονιδίου *tel1* αναιρεί τον φαινότυπο που προκαλείται στα κύτταρα λόγω της υπερέκφρασης του Rif1. Για το λόγο αυτό η υπερέκφραση του Rif1 επαναλήφθηκε σε στέλεχος που έφερε απαλοιφή του *tel1* ενώ παράλληλα εξέφραζε τον παράγοντα Cdc18 υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nmt1*. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής επιβεβαίωσε ότι τα κύτταρα υπόκεινται σε επαναντιγραφή, ενώ η μικροσκοπική παρατήρησή τους έδειξε ότι αποκτούν τη χαρακτηριστική επιμήκη μορφολογία τους. Ωστόσο η ποσοτικοποίηση των υποτελομερικών περιοχών δεν έδειξε κάποια μείωση στα επίπεδα επαναντιγραφής, αντιθέτως οι περιοχές αυτές εμφανίζονται ιδιαίτερως ενισχυμένες. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση δεν περιορίζεται στις υποτελομερικές

περιοχές καθώς παρατηρήθηκε και στην εσωτερική περιοχή ChrI 3.9Mb που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου (εικόνα 4.20).

Μελέτες στον *S.cerevisiae* έχουν δείξει ότι στις περιοχές των τελομερών ο παράγοντας Rif1 καταστέλλει τη δράση της τελομεράσης και την σηματοδότηση των σημείων ελέγχου στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Το Rif1 μαζί με τον παράγοντα Rif2 προσδένονται μέσω του Rap1 στην περιοχή των τελομερών και παίζουν ρόλο στην αναγνώρισή τους ως άκρα των χρωμοσωμάτων και όχι ως διπλές θραύσεις, καταστέλλοντας τη μη ομόλογη ένωση των άκρων (NHEJ). Εκτός από το ρόλο του στα τελομερή το Rif1 δρα και σε εσωτερικές θέσεις των χρωμοσωμάτων του *S.cerevisiae*, μέσω της πρόσδεσής του στα σημεία που έχουν υποστεί διπλή θραύση όπου προάγει τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων DNA τα οποία στη συνέχεια αποτελούν υπόστρωμα για μηχανισμούς επιδιόρθωσης που βασίζονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό [200]. Η δράση του Rif1 στην επαγωγή της επιδιόρθωσης του DNA, θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση που παρουσιάζεται στα επίπεδα επαναντιγραφής των περιοχών που ελέγχθηκαν. Μια υπόθεση εργασίας είναι ότι η δημιουργία διπλών θραύσεων που παρατηρείται κατά την επαναπυροδότηση των αφετηριών προσελκύει τον παράγοντα Rif1 που βρίσκεται σε περίσσεια λόγω υπερέκφρασης και επάγει τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων DNA. Τα μονόκλωνα άκρα που δημιουργούνται, πυροδοτούν μηχανισμού επιδιόρθωσης που βασίζονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό οδηγώντας σε γονιδιακή ενίσχυση των περιοχών αυτών. Επομένως η αύξηση στα επίπεδα επαναντιγραφής που ανιχνεύουμε ενδέχεται να μην οφείλεται αποκλειστικά στη ρύθμιση της πυροδότησης αλλά στη διευκόλυνση της ενσωμάτωσης των επαναντιγραμμένων περιοχών στο γονιδίωμα.

Αντίθετα με το Rif1, η υπερέκφραση του παράγοντα Taz1 επιφέρει μείωση στα επίπεδα επαναντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών, αν και δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική. Φυσιολογικά, ο παράγοντας Taz1 προσδένεται άμεσα στα τελομερή και καταστέλλει τις παρακείμενες αφετηρίες είτε μέσω της στρατολόγησης του Rif1, είτε παρεμποδίζοντας την πρόσδεση παραγόντων έναρξης όπως το Sld3 [51]. Η μικρή μείωση που παρατηρείται στην επαναντιγραφή των υποτελομερικών περιοχών μπορεί να οφείλεται ύπαρξη κάποιου επιπλέον παράγοντα έναρξης όπως ο Rif1 που βρίσκεται επίσης σε περιοριστική συγκέντρωση, επομένως παρά την αυξημένη στρατολόγηση του Taz1 στα τελομερή δεν είναι δυνατή η αύξηση της συγκέντρωσης του Rif1. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα υπερεκφράζει σε πολύ υψηλά επίπεδα στον παράγοντα Cdc18 με αποτέλεσμα

να υπάρχει εκτεταμένη επαναντιγραφή του γονιδιώματος. Μια πιθανή εξήγηση για τη μικρή μείωση της επαναντιγραφής των υποτελομερικών περιοχών λοιπόν θα μπορούσε να είναι ότι τα επίπεδα έκφρασης του Taz1 δεν επαρκούν για να καταστείλουν τα τόσο υψηλά επίπεδα επαναντιγραφής που συμβαίνουν στα τελομερή των κυττάρων.

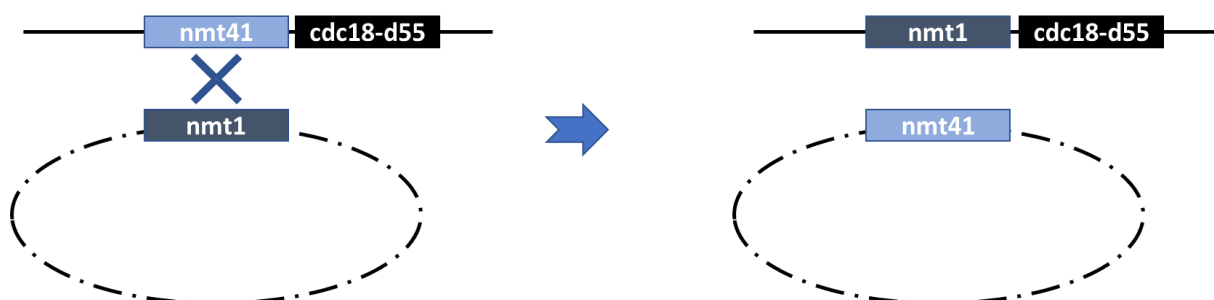
5.1.3 Μελέτη του μηχανισμού πρόκλησης επαναντιγραφής στον *S.pombe*

Με σκοπό την εύρεση νέων μορίων που πιθανά εμπλέκονται στη διαδικασία πρόκλησης της επαναντιγραφής στον *S.pombe* πραγματοποιήθηκε πείραμα γενετικής σάρωσης. Χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος (ZP517) το οποίο φέρει το γονίδιο *cdc18-d55* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nmt41* και τον υπερεκφράζει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, τα οποία δεν επαρκούν για την πρόκληση της επαναντιγραφής. Το συγκεκριμένο στέλεχος αποτελεί ένα ιδανικό γενετικό εργαλείο για το σκοπό αυτό. Η επαγωγή του *nmt* υποκινητή στο στέλεχος αυτό οδηγεί σε υπερέκφραση του *cdc18-d55* σε πολύ χαμηλά επίπεδα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην αποκτούν το χαρακτηριστικό φαινότυπο της επαναντιγραφής. Το χαρακτηριστικό αυτό επιτρέπει τη χρήση του συγκεκριμένου στελέχους για τη διερεύνηση συνθετικών αλληλεπιδράσεων μέσω γενετικής σάρωσης.

Η γενετική σάρωση έγινε με τη χρήση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης υπερέκφρασης και στόχος ήταν η εύρεση γονιδίων των οποίων η ταυτόχρονη υπερέκφραση με τον παράγοντα Cdc18 θα προκαλεί επαναντιγραφή του DNA. Τα κύτταρα του στελέχους ZP517 μετασχηματίστηκαν αρχικά με την γονιδιωματική βιβλιοθήκη και οι αποικίες που σχηματίστηκαν, καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες που επέτρεπαν την επαγωγή της έκφρασης του Cdc18. Το πρώτο στάδιο της σάρωσης έγινε με βάση τη φαινοτυπική παρατήρηση των αποικιών σε απλό φωτονικό μικροσκόπιο. Σαρώθηκαν 50.000 αποικίες και επιλέχθηκαν εκείνες που εμφάνιζαν επιμηκυμένο φαινότυπο, ο οποίος αποτελεί ένδειξη παρεμπόδισης του κυτταρικού κύκλου λόγω επαναντιγραφής. Στη συνέχεια, ακολούθησε το δεύτερο στάδιο της σάρωσης όπου οι θετικές αποικίες που επιλέχθηκαν, ελέγχθηκαν ως προς την αύξηση του περιεχόμενου DNA τους με κυτταρομετρία ροής. Τρεις αποικίες βρέθηκαν θετικές με την παραπάνω διαδικασία οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να γίνει ανάκτηση των πλασμιδίων που

περιείχαν, ενώ ακολούθησε επαναμετασχηματισμός του στελέχους ZP517 με τα πλασμίδια αυτά για την επιβεβαίωση του φαινοτύπου που προκαλούν, αλλά και ταυτοποίηση των γονιδίων που περιέχουν με αλληλούχιση. Δύο εκ των τριών πλασμιδίων που απομονώθηκαν προκάλεσαν επαναντιγραφή στο στέλεχος ZP517 έπειτα από επαγωγή του *nmt* υποκινητή. Η αλληλούχιση των πλασμιδίων αυτών έδειξε ότι και τα δύο περιλαμβάνουν το γονίδιο *nmt1* μαζί με τον υποκινητή του.

Μια πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση φαινοτύπου στην συγκεκριμένη περίπτωση θα μπορούσε να αποτελέσει η γονιδιακή μετατροπή (gene conversion). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, δύο περιοχές που εμφανίζουν υψηλή ομολογία μπορούν να ανασυνδυαστούν, με αποτέλεσμα η μία περιοχή να μετασχηματιστεί από την άλλη. Ο υποκινητής *nmt41* του στελέχους ZP517 διαφέρει μόνο σε τρεις βάσεις σε σχέση με τον αγρίου τύπου υποκινητή του γονιδίου *nmt1*, διευκολύνοντας πιθανά τον ανασυνδυασμό μεταξύ των δύο υποκινητών. Το αποτέλεσμα θα ήταν η μεταφορά του ισχυρού *nmt1* υποκινητή ανοδικά του γονιδίου *cdc18-d55* και αντίστοιχα ο ασθενέστερος υποκινητής *nmt41* θα μεταφερόταν ανοδικά του γονιδίου *nmt*. Στο στέλεχος που δημιουργείται μετά το πέρας της γονιδιακής μετατροπής, το γονίδιο *cdc18-d55* βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ισχυρότερου υποκινητή γεγονός που εξηγεί την εμφάνιση φαινοτύπου επαναντιγραφής.



Εικόνα 5.2 Η υψηλή ομολογία μεταξύ του *nmt1* υποκινητή του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης και του *nmt41* του στελέχους ZP517 οδηγεί σε γονιδιακή μετατροπή η οποία φέρει τελικά το γονίδιο *cdc18-d55* υπό τον έλεγχο του του *nmt1* υποκινητή. Με μαύρη συνεχή γραμμή παρουσιάζεται το γονιδίωμα του στελέχους ZP517 ενώ με διακεκομμένη το πλασμίδιο της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Ανασυνδυασμός μεταξύ των δύο υποκινητών έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του *nmt1* ανοδικά του γονιδίου *cdc18-d55* αυξάνοντας τα επίπεδα υπερέκφρασής του σε συνθήκες επαγωγής και οδηγώντας τα κύτταρα σε επαναντιγραφή.

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι για τη διερεύνηση νέων μορίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της επαναντιγραφής μέσω γενετικής σάρωσης, απαιτείται η χρήση διαφορετικού στέλεχους *S.pombe* που να μη φέρει το γονίδιο *cdc18* κάτω από τον έλεγχο του επαγόμενου υποκινητή *hmt1*. Εναλλακτικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στέλεχος που φέρει τη μεταλλαγή *cdc18-T6A*. Αυτή η μεταλλαγμένη μορφή του *Cdc18* δε διαθέτει 6 θέσεις φωσφορυλίωσης από τη CDK. Η απουσία των θέσεων αυτών έχει οδηγήσει στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της πρωτεΐνης *Cdc18* παραμένουν υψηλότερα από το φυσιολογικό χωρίς τη χρήση επαγόμενου υποκινητή [187].

5.2 Επαναντιγραφή DNA και γονιδιακή ενίσχυση στον καρκίνο

Η υπερέκφραση του παράγοντα *Cdt1* είναι ικανή να προκαλέσει επαναντιγραφή και σε κύτταρα ανώτερων ευκαρυωτών, [99, 103], ενώ η ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων του *Cdc6* φαίνεται να ενισχύει τον φαινότυπο της επαναντιγραφής [99]. Εκτός από το ρόλο του στην αδειοδότηση, το *Cdc6* έχει δειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση του γενετικού τόπου *INK/ARF* αλλά και την έκφραση του γονιδίου *E-cadherin*, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην καρκινογένεση και την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων [201]. Αρκετοί τύποι καρκίνου εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των παραγόντων *Cdt1* και *Cdc6*. Μελέτες σε κλινικά δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, λέμφωμα μανδύα, καρκίνο του παχέος εντέρου ή καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου έδειξαν ότι οι όγκοι παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης των *Cdt1* και *Cdc6* [115-117].

Η επαναπυροδότηση των αφετηριών που λαμβάνει χώρα κατά την επαναντιγραφή, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ιδιαίτερων δομών στο DNA που καταλήγουν στη σύγκρουση των αντιγραφικών θηλιών και τη δημιουργία διπλών θραύσεων στο γονιδίωμα. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η ενεργοποίηση σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αλλά και μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA [99, 107, 108]. Έχει προταθεί ότι η επίλυση των δομών DNA που σχηματίζονται κατά την επαναντιγραφή μπορεί να οδηγήσουν σε ενίσχυση των αντίστοιχων περιοχών. Οι ενισχυμένες περιοχές σε αυτές τις περιπτώσεις μπορούν είτε να σχηματίζουν εξωχρωμοσωμικές δομές είτε να ενσωματώνονται στο γονιδίωμα. Η γονιδιακή

ενίσχυση αποτελεί ένα είδος γονιδιακής αστάθειας που εμφανίζεται πολύ συχνά σε καρκινικά κύτταρα, ενώ συμμετέχει στην εξέλιξη της νόσου. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων προάγοντας την καρκινογένεση. Ογκογονίδια όπως το MYC, MYCN, ERBB2 (HER-2/neu) και ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR) έχουν εντοπιστεί σε ενισχυμένες περιοχές των γονιδιωμάτων καρκινικών κυττάρων [147, 148]. Επιπλέον η ενίσχυση γονιδίων που αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας των όγκος σε αντικαρκινικά φάρμακα, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη διατήρηση της νόσου.

5.2.1 Συσχέτιση του φαινομένου της επαναντιγραφής με τη γονιδιακή ενίσχυση σε καρκινικά δείγματα ασθενών

Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι η υπερέκφραση των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην επαναντιγραφή, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν τα αυξημένα επίπεδα αυτών μπορούν να συσχετιστούν με το φαινόμενο της γονιδιακής ενίσχυσης. Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της επαναντιγραφής που προκαλείται κατά της απορρύθμιση της έκφρασης των Cdt1 και Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καρκινικά δείγματα ασθενών τα οποία είναι διαθέσιμα μέσω του TCGA.

Αρχικά μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των Cdt1 και Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης σε συγκεκριμένους τόπους που γνωρίζουμε ότι υπόκεινται σε γονιδιακή ενίσχυσή στον καρκίνο. Σε δείγματα ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού, η ανάλυση των δεδομένων αυτών έδειξε ότι τα δείγματα που χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση των παραγόντων Cdt1 ή Cdc6 έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης γονιδιακής ενίσχυσης στους γενετικούς τόπους των γονιδίων MYC, CCND1, ASPH και ERBB2. Παρόμοια συσχέτιση αποκαλύφθηκε και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, το πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα και το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου όπου φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων αυτών σχετίζονται θετικά με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης των γονιδίων MYC και CCND1. Εκτός από την ανάλυση μεμονωμένων τόπων έγινε προσπάθεια συσχέτισης της επαναντιγραφής με

την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μετρική amplification score προκειμένου να προσδιοριστούν τα συνολικά επίπεδα επαναντιγραφής του γονιδιώματος κάθε ασθενή. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό χαρακτηρίζονταν από υψηλότερο amplification score. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς οκτώ διαφορετικών τύπου καρκίνου, στηρίζοντας έτσι την υπόθεση ότι η επαναντιγραφή που προκαλείται μέσω της απορρύθμισης της έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 μπορεί να αποτελεί έναν γενικό μηχανισμό γονιδιακής ενίσχυσης στον καρκίνο.

5.2.2 Η γονιδιακή ενίσχυση των δειγμάτων με αυξημένα επίπεδα Cdt1 και Cdc6 είναι ανεξάρτητη από την πολλαπλασιαστική ικανότητά τους

Η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, αποτελεί ένδειξη της σωστής λειτουργίας τους. Η αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενός ιστού σημαίνει ότι διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών της κυτταρικής διαίρεσης και του κυτταρικού θανάτου με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Οι παράγοντες Ki67 και PCNA αποτελούν δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η χρήση τους ως προγνωστικοί δείκτες είναι διαδεδομένη, καθώς αυξημένα επίπεδα έκφρασής τους έχουν σχετιστεί με επιθετική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων [194]. Ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων έχει συσχετιστεί σε κάποιες περιπτώσεις και με τη γονιδιακή ενίσχυση [195]. Η ανάλυση των δεδομένων ασθενών με καρκίνο του μαστού έδειξε ότι υπάρχει όντως θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Ki67 και PCNA. Ωστόσο, φαίνεται πως μόνο ένα μέρος της γονιδιακής ενίσχυσης οφείλεται στην αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, καθώς σε δείγματα όγκων που φέρουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης των παραγόντων Ki67 και PCNA υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης των Cdt1/Cdc6 και γονιδιακής ενίσχυσης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι στα δείγματα που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση του παράγοντα PCNA παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Cdc6 αλλά όχι του Cdt1 και της γονιδιακής ενίσχυσης. Το PCNA έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων του Cdt1 [202, 203]. Συγκεκριμένα, η

αμινοτελική περιοχή του Cdt1 διαθέτει θέση πρόσδεσης για το PCNA, ενώ η αλληλεπίδρασή τους οδηγεί στην αποικοδόμηση του Cdt1 κατά τη φάση S είτε παρουσία βλάβης στο DNA. Η παρούσα ανάλυση λαμβάνει υπόψιν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων και όχι τα επίπεδα πρωτεΐνης. Στα δείγματα λοιπόν που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση PCNA, τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα Cdt1 δεν συνεπάγονται και αυξημένα επίπεδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης, εφόσον το PCNA δρα μετα-μεταφραστικά. Έτσι λοιπόν η απουσία συσχέτισης της γονιδιακής ενίσχυσης με τα επίπεδα έκφρασης του Cdt1 σε όγκους με αυξημένη έκφραση του παράγοντα PCNA μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη αποικοδόμηση του Cdt1.

5.2.3 Η λειτουργικότητα του παράγοντα p53 επηρεάζει τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης

Αρκετές μελέτες έχουν υποδείξει ότι η υπερέκφραση του παράγοντα Cdt1 συσχετίζεται με την εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε περιπτώσεις που ο παράγοντας p53 δεν είναι λειτουργικός. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η γονιδιακή ενίσχυση του γενετικού τόπου ERBB2 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού συσχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα του Cdt1 μόνο στους ασθενείς που φέρουν λειτουργικό p53. Ομοίως, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης του Cdt1 στα δείγματα που είχαν λειτουργικό p53. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (διδακτορική διατριβή Ελεάννας Συμεωνίδου) όπου παρατηρήθηκε αυξημένη συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των Cdt1 και Erbb2 σε ιστούς που χαρακτηρίζονταν από χαμηλά επίπεδα έκφρασης του παράγοντα p53, το οποίο συνεπάγεται την ύπαρξη λειτουργικού p53. Έχειδειχθεί ότι η θετική ανοσοϊστοχημική εντόπιση του παράγοντα p53 αποτελεί ένδειξη παρουσίας μεταλλάξεων στον αντίστοιχο γενετικό τόπο [204]. Οι μεταλλάξεις του p53 συχνά εμποδίζουν την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα τον αύξηση του χρόνου ημιζωής της και την συσσώρευση στα κύτταρα.

Η διαφορά στη συσχέτιση μεταξύ γονιδιακής ενίσχυσης του γενετικού τόπου ERBB2 και αυξημένων επιπέδων του Cdt1 ανάλογε με την ύπαρξη ή όχι λειτουργικού p53 μπορεί να οφείλεται στην έκταση της γονιδιωματικής αλλαγής που πραγματοποιείται στις δύο περιπτώσεις. Έτσι λοιπόν η υπερέκφραση του παράγοντα Cdt1 οδηγεί σε επαναντιγραφή και το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από τη

λειτουργικότητα του p53. Σε περιπτώσεις που υπάρχει μη φυσιολογικό p53, τα κύτταρα αδυνατούν να ανταποκριθούν στις βλάβες που προκαλούνται στο DNA και να προχωρήσουν σε αναστολή τους κυτταρικού τους κύκλου με αποτέλεσμα να συνεχίζεται ο ανεξέλεγκτος υπερδιπλασιασμός του γονιδιώματος και να προκαλούνται εκτεταμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Αντιθέτως, η ύπαρξη λειτουργικού p53 εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα θα ανταποκριθούν στη βλάβη και θα σταματήσουν τον κυτταρικό τους κύκλο προκειμένου να την επιδιορθώσουν. Αν η βλάβη που έχουν υποστεί είναι εκτεταμένη, τα κύτταρα θα οδηγηθούν σε απόπτωση. Σε περίπτωση που η βλάβη είναι περιορισμένη, όπως για παράδειγμα αυτή που προκαλείται κατά την επαναντιγραφή κάποιων περιοχών του γονιδιώματος, η προσπάθεια επιδιόρθωσης των υπερδιπλασιασμένων περιοχών μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιακή ενίσχυση.

Η λειτουργικότητα του p53 ωστόσο φαίνεται να μην επηρεάζει τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του παράγοντα Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η υπερέκφραση του Cdc6 δε μπορεί να οδηγήσει σε τόσο μεγάλο βαθμό σε επαναντιγραφή του γονιδιώματος στα ανθρώπινα κύτταρα [99]. Έτσι λοιπόν, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν Cdc6, δεν παρουσιάζουν εκτεταμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, ενώ προσπάθεια των κυττάρων για επιδιόρθωση της βλάβης θα οδηγήσει σε γονιδιακή ενίσχυση περιοχών που έχουν υποστεί επαναντιγραφή είτε παρουσία είτε απουσία λειτουργικού p53.

5.2.4 Η έκφραση της κυκλίνης A2 επηρεάζει τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης του γενετικού τόπου ERBB2.

Η κυκλίνη A2 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθορίζοντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S και από την G2 στην M. Η υπερέκφρασή της έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, ενώ χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης της νόσου [196]. Εκτός από το ρόλο της στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η κυκλίνη A παίζει άμεσο ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων του παράγοντα Cdt1. Συγκεκριμένα, η κυκλίνη A2 φωσφορυλιώνει το Cdt1 γεγονός που προκαλεί την αναγνώριση του αδειοδοτικού παράγοντα από το σύμπλοκο SCF-Skp2, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην αποικοδόμηση του [85, 197]. Στην

παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των επιπέδων της κυκλίνης A2 τόσο στη γονιδιακή ενίσχυση του γενετικού τόπου ERBB2 όσο και στη συνολική γονιδιακή ενίσχυση σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο του μαστού. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι η συσχέτιση μεταξύ επιπέδων Cdt1 και ενίσχυσης του τόπου ERBB2 είναι στατιστικά σημαντική μόνο στα δείγματα ασθενών που χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα κυκλίνης A2. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (διδακτορική διατριβή Ελεάννας Συμεωνίδου) όπουδείχθηκε ότι υπάρχει αυξημένη συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των Cdt1 και Erbb2 σε ιστούς που χαρακτηρίζονταν από χαμηλά επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης A2.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση των επιπέδων της κυκλίνης A2 στη συνολική γονιδιακή ενίσχυση. Μεμονωμένα, η έκφραση της κυκλίνης A2 σχετίζεται θετικά με την αυξημένη συνολική γονιδιακή ενίσχυση. Στα δείγματα ασθενών τόσο με χαμηλή όσο και υψηλή έκφραση Ccna2, η αύξηση της έκφρασης του Cdc6 συσχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων γονιδιακής ενίσχυσης, δείχνοντας ότι ένα μέρος της γονιδιακής ενίσχυσης που παρατηρείται σε δείγματα με αυξημένο Cdc6 είναι ανεξάρτητο από τα επίπεδα της κυκλίνης A2. Στην περίπτωση του Cdt1 ωστόσο, δε βρέθηκε αντίστοιχη συσχέτιση. Συγκεκριμένα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης στα δείγματα είτε με χαμηλή είτε υψηλή έκφραση Ccna2. Φαίνεται λοιπόν πως η συσχέτιση της έκφρασης του Cdt1 με τη γονιδιακή ενίσχυση επηρεάζεται από τα επίπεδα της κυκλίνης A2, γεγονός που πιθανά σχετίζεται με την άμεση ρύθμιση του Cdt1 από την κυκλίνη A σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

5.2.5 Συμβολή των μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης της βλάβης στη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 και των επιπέδων ενίσχυσης

Μελέτες έχουν δείξει ότι η επαναपुरοδότηση των ίδιων αφετηριών που πραγματοποιείται κατά την επαναντιγραφή του DNA, δημιουργεί χαρακτηριστικές δομές όπου διχάλες αντιγραφής αναδύονται μέσα από ήδη υπάρχουσες διχάλες. Καθώς η αντιγραφή εξελίσσεται, οι διχάλες αυτές συχνά συγκρούονται [105]. Η σύγκρουση αυτή οδηγεί σε θραύσεις στο DNA οι οποίες ενεργοποιούν ATM και ATR-εξαρτώμενα σημεία ελέγχου κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου [108] που αποσκοπούν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποίηση ειδικών μηχανισμών επιδιόρθωσης. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι η ATR παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή της επαναντιγραφής, ειδικά σε περιπτώσεις όπου υπάρχει

δυσλειτουργία του συστήματος αδειοδότησης [108]. Οι περιοχές που έχουν υποστεί επαναντιγραφή μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα μηχανισμών όπως ο ομόλογος ανασυνδυασμός, οδηγώντας τελικά στη γονιδιακή ενίσχυση [106].

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού, υπέδειξε αρχικά ότι τα επίπεδα έκφρασης της ATR σχετίζονται θετικά με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα αυξημένα επίπεδα της ATR χωρίς αντίστοιχα υψηλά επίπεδα έκφρασης των επιπέδων είτε του Cdt1 είτε του Cdc6 δεν επαρκεί για την αύξηση της γονιδιακής ενίσχυσης. Παρατηρείται λοιπόν, ότι η ATR δρα συνεργατικά προκειμένου να ενισχύσει την γονιδιακή ενίσχυση που προκαλείται κατά την αυξημένη έκφραση των Cdt1 και Cdc6. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με την υπάρχουσα γνώση ότι η ενεργοποίηση των ATR-εξαρτώμενων σημείων ελέγχου αποτελεί βασική προϋπόθεση ώστε τα κύτταρα να προχωρήσουν σε επιδιόρθωση των βλαβών του γενετικού τους υλικού, η οποία τελικά θα οδηγήσει σε γονιδιακή ενίσχυση των υπερδιπλασιασμένων περιοχών του γονιδιώματος. Προκειμένου να διερευνηθεί αν κάποιο από τα βασικά μονοπάτια επιδιόρθωσης παίζει επίσης συνεργατικό ρόλο στη διαδικασία της γονιδιακής ενίσχυσης κατά την επαναντιγραφή, μελετήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης δύο βασικών παραγόντων του ομόλογου ανασυνδυασμού (Rad51, Rad52) και δύο παραγόντων του μηχανισμού μη ομόλογης ένωσης άκρων (Xrcc5, Xrcc6) με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης. Από τους παράγοντες του ομόλογου ανασυνδυασμού που μελετήθηκαν μόνο η έκφραση του Rad51 φαίνεται να σχετίζεται θετικά με την αύξηση γονιδιακής ενίσχυσης, ωστόσο περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα του Rad51 δεν επηρεάζουν τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης. Αντίθετα, η έκφραση του Rad52 καθώς και των παραγόντων που συμμετέχουν στη μη ομόλογη ένωση των άκρων φαίνεται ότι δε σχετίζεται με τη γονιδιακή ενίσχυση κατά μήκος του γονιδιώματος.

5.2.6 Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Cdt1 συσχετίζονται με συγκεκριμένα προφίλ γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος.

Η παρούσα ανάλυση έδειξε ότι σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού τα αυξημένα επίπεδα Cdt1 και Cdc6 συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος. Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε αν υπάρχουν συγκεκριμένα προφίλ γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος των χρωμοσωμάτων που να παρατηρούνται κυρίως κατά την αυξημένη έκφραση είτε του Cdt1 είτε του Cdc6. Για το σκοπό αυτό οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν με βάση τα πρότυπα γονιδιακής ενίσχυσης που εμφανίζουν και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των Cdt1 και Cdc6 μεταξύ των ομάδων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που περιλαμβάνουν τον αριθμό αντιγράφων κατά μήκος του γονιδιώματος, βάση των οποίων χωρίστηκαν σε έξι ομάδες χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ιεραρχικής ομαδοποίησης. Η σύγκριση των επιπέδων τόσο του Cdt1 όσο και του Cdc6 μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έδειξε ότι μια από τις ομάδες εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του Cdt1. Φαίνεται λοιπόν πως τα δείγματα που υπερεκφράζουν τον παράγοντα Cdt1 τείνουν να εμφανίζουν ενίσχυση σε συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περιοχές που εμφανίζονται ενισχυμένες κατά την υπερέκφραση του Cdt1 περιλαμβάνουν αποδοτικές αφετηρίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές φορές κατά τη διάρκεια της επαναντιγραφής. Κατ' επέκταση η αυξημένη επαναντιγραφή στις συγκεκριμένες περιοχές οδηγεί και σε αυξημένη συχνότητα γονιδιακής ενίσχυσης αυτών δημιουργώντας έτσι χαρακτηριστικά πρότυπα γονιδιακής ενίσχυσης κατά μήκος των χρωμοσωμάτων.

Η ανάλυση δεδομένων καρκίνων δειγμάτων έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των αδειοδοτικών παραγόντων Cdt1 και Cdc6 στον καρκίνο του μαστού σχετίζονται με την εμφάνιση γονιδιακής ενίσχυσης τόσο σε μεμονωμένους γενετικούς τόπους όσο και κατά μήκος του γονιδιώματος. Η συσχέτιση αυτή παρατηρήθηκε και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως το αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα, το πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα και το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων Cdt1/Cdc6 σχετίζονται με τη γονιδιακή ενίσχυση ανεξάρτητα από την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων. Επιπλέον, η συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης Cdt1 και γονιδιακής ενίσχυσης παρατηρήθηκε μόνο σε δείγματα που φέρουν λειτουργικό τον παράγοντα p53, ενώ αντίστοιχα η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης είναι ανεξάρτητη της κατάστασης του p53. Η διερεύνηση των μηχανισμών απόκρισης σε βλάβη έδειξε παρουσία υψηλών επιπέδων Cdt1 και Cdc6, η αύξηση της έκφρασης του παράγοντα ATR σχετίζεται με αυξημένη γονιδιακή ενίσχυση. Περαιτέρω ανάλυση παραγόντων που εμπλέκονται στα δύο κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA, τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Rad51, Rad52) και τη μη ομόλογη ένωση άκρων (Xrcc5, Xrcc6) έδειξε ότι η έκφραση τους δεν επηρεάζει τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του Cdt1 και Cdc6 και της γονιδιακής ενίσχυσης. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα Cdt1 εμφανίζουν συγκεκριμένα πρότυπα ενίσχυσης κατά μήκος του γονιδιώματος, ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να ταυτοποιηθούν.

Η μελέτη του φαινομένου της γονιδιακής ενίσχυσης αποτελεί σημαντικό κομμάτι της έρευνας του καρκίνου. Η ενίσχυση γενετικών τόπων αποτελεί ένα βασικό μηχανισμό της καρκινογένεσης. Το φαινόμενο αυτό συμβάλει στα πρωταρχικά στάδια της καρκινογένεσης μέσω της ενίσχυσης γενετικών τόπων που περιλαμβάνουν ογκογονίδια οδηγώντας σε κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων. Στη συνέχεια συμβάλει στη διατήρηση και εξέλιξη της νόσου μέσω της ενίσχυσης γονιδίων που αποτελούν στόχους αντικαρκινικών φαρμάκων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτά. Η μελέτη των μηχανισμών που οδηγούν στη γονιδιακή ενίσχυση είναι πολύ σημαντική για την ανακάλυψη συνδυαστικών και αποτελεσματικών θεραπειών που στοχεύουν σε εξειδικευμένους στόχους.

6. Βιβλιογραφία

1. Cvetic, C. and J.C. Walter, *Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific?* Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(3): p. 343-53.
2. Leonard, A.C. and M. Mechali, *DNA replication origins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(10): p. a010116.
3. Symeonidou, I.E., S. Taraviras, and Z. Lygerou, *Control over DNA replication in time and space*. FEBS Lett, 2012. **586**(18): p. 2803-12.
4. Gaudier, M., et al., *Structural basis of DNA replication origin recognition by an ORC protein*. Science, 2007. **317**(5842): p. 1213-6.
5. Duncker, B.P., I.N. Chesnokov, and B.J. McConkey, *The origin recognition complex protein family*. Genome Biol, 2009. **10**(3): p. 214.
6. Bleichert, F., M.R. Botchan, and J.M. Berger, *Crystal structure of the eukaryotic origin recognition complex*. Nature, 2015. **519**(7543): p. 321-6.
7. Sun, J., et al., *Cdc6-induced conformational changes in ORC bound to origin DNA revealed by cryo-electron microscopy*. Structure, 2012. **20**(3): p. 534-44.
8. Tocilj, A., et al., *Structure of the active form of human origin recognition complex and its ATPase motor module*. Elife, 2017. **6**.
9. Bleichert, F., et al., *Conformational control and DNA-binding mechanism of the metazoan origin recognition complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(26): p. E5906-E5915.
10. Evrin, C., et al., *A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20240-5.
11. Yuan, Z., et al., *Structural basis of Mcm2-7 replicative helicase loading by ORC-Cdc6 and Cdt1*. Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(3): p. 316-324.
12. Remus, D., et al., *Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing*. Cell, 2009. **139**(4): p. 719-30.
13. Fernandez-Cid, A., et al., *An ORC/Cdc6/MCM2-7 complex is formed in a multistep reaction to serve as a platform for MCM double-hexamer assembly*. Mol Cell, 2013. **50**(4): p. 577-88.
14. Ticau, S., et al., *Single-molecule studies of origin licensing reveal mechanisms ensuring bidirectional helicase loading*. Cell, 2015. **161**(3): p. 513-525.

15. Lyubimov, A.Y., et al., *ATP-dependent conformational dynamics underlie the functional asymmetry of the replicative helicase from a minimalist eukaryote*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. 11999-2004.
16. Samel, S.A., et al., *A unique DNA entry gate serves for regulated loading of the eukaryotic replicative helicase MCM2-7 onto DNA*. Genes Dev, 2014. **28**(15): p. 1653-66.
17. Zhai, Y., et al., *Open-ringed structure of the Cdt1-Mcm2-7 complex as a precursor of the MCM double hexamer*. Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(3): p. 300-308.
18. Frigola, J., et al., *Cdt1 stabilizes an open MCM ring for helicase loading*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15720.
19. Ticau, S., et al., *Mechanism and timing of Mcm2-7 ring closure during DNA replication origin licensing*. Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(3): p. 309-315.
20. Tanaka, S., et al., *CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast*. Nature, 2007. **445**(7125): p. 328-32.
21. Zegerman, P. and J.F. Diffley, *Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast*. Nature, 2007. **445**(7125): p. 281-5.
22. Tanaka, S., et al., *Efficient initiation of DNA replication in eukaryotes requires Dpb11/TopBP1-GINS interaction*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(13): p. 2614-22.
23. Sheu, Y.J. and B. Stillman, *The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4*. Nature, 2010. **463**(7277): p. 113-7.
24. Randell, J.C., et al., *Mec1 is one of multiple kinases that prime the Mcm2-7 helicase for phosphorylation by Cdc7*. Mol Cell, 2010. **40**(3): p. 353-63.
25. Deegan, T.D., J.T. Yeeles, and J.F. Diffley, *Phosphopeptide binding by Sld3 links Dbf4-dependent kinase to MCM replicative helicase activation*. EMBO J, 2016. **35**(9): p. 961-73.
26. Bruck, I. and D.L. Kaplan, *Conserved mechanism for coordinating replication fork helicase assembly with phosphorylation of the helicase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(36): p. 11223-8.
27. Costa, A., et al., *The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(4): p. 471-7.
28. Costa, A., et al., *DNA binding polarity, dimerization, and ATPase ring remodeling in the CMG helicase of the eukaryotic replisome*. Elife, 2014. **3**: p. e03273.

29. van Deursen, F., et al., *Mcm10 associates with the loaded DNA helicase at replication origins and defines a novel step in its activation*. EMBO J, 2012. **31**(9): p. 2195-206.
30. Kanke, M., et al., *Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after loading of the CMG components*. EMBO J, 2012. **31**(9): p. 2182-94.
31. Looke, M., M.F. Maloney, and S.P. Bell, *Mcm10 regulates DNA replication elongation by stimulating the CMG replicative helicase*. Genes Dev, 2017. **31**(3): p. 291-305.
32. Izumi, M., et al., *The Mcm2-7-interacting domain of human mini-chromosome maintenance 10 (Mcm10) protein is important for stable chromatin association and origin firing*. J Biol Chem, 2017. **292**(31): p. 13008-13021.
33. Douglas, M.E., et al., *The mechanism of eukaryotic CMG helicase activation*. Nature, 2018. **555**(7695): p. 265-268.
34. Leman, A.R. and E. Noguchi, *The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication*. Genes (Basel), 2013. **4**(1): p. 1-32.
35. Heichinger, C., et al., *Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins*. EMBO J, 2006. **25**(21): p. 5171-9.
36. Yang, S.C., N. Rhind, and J. Bechhoefer, *Modeling genome-wide replication kinetics reveals a mechanism for regulation of replication timing*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 404.
37. Hyrien, O., et al., *From simple bacterial and archaeal replicons to replication N/U-domains*. J Mol Biol, 2013. **425**(23): p. 4673-89.
38. Azmi, I.F., et al., *Nucleosomes influence multiple steps during replication initiation*. Elife, 2017. **6**.
39. Eaton, M.L., et al., *Conserved nucleosome positioning defines replication origins*. Genes Dev, 2010. **24**(8): p. 748-53.
40. Soriano, I., et al., *Different nucleosomal architectures at early and late replicating origins in Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 791.
41. Rodriguez, J., et al., *Nucleosome occupancy as a novel chromatin parameter for replication origin functions*. Genome Res, 2017. **27**(2): p. 269-277.
42. Unnikrishnan, A., P.R. Gafken, and T. Tsukiyama, *Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(4): p. 430-7.
43. Smith, O.K., et al., *Distinct epigenetic features of differentiation-regulated replication origins*. Epigenetics Chromatin, 2016. **9**: p. 18.

44. Cayrou, C., et al., *The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes*. *Genome Res*, 2015. **25**(12): p. 1873-85.
45. Pohl, T.J., B.J. Brewer, and M.K. Raghuraman, *Functional centromeres determine the activation time of pericentric origins of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae**. *PLoS Genet*, 2012. **8**(5): p. e1002677.
46. Hayashi, M.T., et al., *The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(3): p. 357-62.
47. Knott, S.R., et al., *Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae**. *Cell*, 2012. **148**(1-2): p. 99-111.
48. Peace, J.M., et al., *Quantitative BrdU immunoprecipitation method demonstrates that Fkh1 and Fkh2 are rate-limiting activators of replication origins that reprogram replication timing in G1 phase*. *Genome Res*, 2016. **26**(3): p. 365-75.
49. Fang, D., et al., *Dbf4 recruitment by forkhead transcription factors defines an upstream rate-limiting step in determining origin firing timing*. *Genes Dev*, 2017. **31**(23-24): p. 2405-2415.
50. Hayano, M., et al., *Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast*. *Genes Dev*, 2012. **26**(2): p. 137-50.
51. Tazumi, A., et al., *Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast*. *Genes Dev*, 2012. **26**(18): p. 2050-62.
52. Dave, A., et al., *Protein phosphatase 1 recruitment by Rif1 regulates DNA replication origin firing by counteracting DDK activity*. *Cell Rep*, 2014. **7**(1): p. 53-61.
53. Hiraga, S., et al., *Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex*. *Genes Dev*, 2014. **28**(4): p. 372-83.
54. Mattarocci, S., et al., *Rif1 controls DNA replication timing in yeast through the PP1 phosphatase Glc7*. *Cell Rep*, 2014. **7**(1): p. 62-9.
55. Hiraga, S.I., et al., *Human RIF1 and protein phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation*. *EMBO Rep*, 2017. **18**(3): p. 403-419.
56. Alver, R.C., et al., *Reversal of DDK-Mediated MCM Phosphorylation by Rif1-PP1 Regulates Replication Initiation and Replisome Stability Independently of ATR/Chk1*. *Cell Rep*, 2017. **18**(10): p. 2508-2520.

57. Wu, P.Y. and P. Nurse, *Establishing the program of origin firing during S phase in fission Yeast*. Cell, 2009. **136**(5): p. 852-64.
58. Patel, P.K., et al., *The Hsk1(Cdc7) replication kinase regulates origin efficiency*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5550-8.
59. Mantiero, D., et al., *Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast*. EMBO J, 2011. **30**(23): p. 4805-14.
60. Tanaka, S., et al., *Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing*. Curr Biol, 2011. **21**(24): p. 2055-63.
61. Wong, P.G., et al., *Cdc45 limits replicon usage from a low density of preRCs in mammalian cells*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17533.
62. Kohler, C., et al., *Cdc45 is limiting for replication initiation in humans*. Cell Cycle, 2016. **15**(7): p. 974-85.
63. Davidson, M.B., et al., *Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype*. EMBO J, 2012. **31**(4): p. 895-907.
64. Poli, J., et al., *dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress*. EMBO J, 2012. **31**(4): p. 883-94.
65. Heun, P., et al., *The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus*. J Cell Biol, 2001. **152**(2): p. 385-400.
66. Ebrahimi, H., et al., *Early initiation of a replication origin tethered at the nuclear periphery*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1015-9.
67. Zappulla, D.C., R. Sternglanz, and J. Leatherwood, *Control of replication timing by a transcriptional silencer*. Curr Biol, 2002. **12**(11): p. 869-75.
68. Ostrow, A.Z., et al., *Conserved forkhead dimerization motif controls DNA replication timing and spatial organization of chromosomes in S. cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(12): p. E2411-E2419.
69. Aparicio, O.M., *Location, location, location: it's all in the timing for replication origins*. Genes Dev, 2013. **27**(2): p. 117-28.
70. Moindrot, B., et al., *3D chromatin conformation correlates with replication timing and is conserved in resting cells*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(19): p. 9470-81.
71. Pope, B.D., et al., *Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 402-5.
72. Dileep, V., et al., *Topologically associating domains and their long-range contacts are established during early G1 coincident with the establishment of the replication-timing program*. Genome Res, 2015. **25**(8): p. 1104-13.

73. Foti, R., et al., *Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program*. Mol Cell, 2016. **61**(2): p. 260-73.
74. Kanoh, Y., et al., *Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(11): p. 889-97.
75. Masai, H., et al., *Telomere-binding factors in the regulation of DNA replication*. Genes Genet Syst, 2018. **92**(3): p. 119-125.
76. Coudreuse, D. and P. Nurse, *Driving the cell cycle with a minimal CDK control network*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1074-9.
77. Machida, Y.J., J.L. Hamlin, and A. Dutta, *Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans*. Cell, 2005. **123**(1): p. 13-24.
78. Tanaka, S. and J.F. Diffley, *Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(3): p. 198-207.
79. Labib, K., J.F. Diffley, and S.E. Kearsey, *G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(7): p. 415-22.
80. Drury, L.S., G. Perkins, and J.F. Diffley, *The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle*. Curr Biol, 2000. **10**(5): p. 231-40.
81. Kominami, K., I. Ochotorena, and T. Toda, *Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase*. Genes Cells, 1998. **3**(11): p. 721-35.
82. Wolf, D.A., F. McKeon, and P.K. Jackson, *Budding yeast Cdc6p induces re-replication in fission yeast by inhibition of SCF(Pop)-mediated proteolysis*. Mol Gen Genet, 1999. **262**(3): p. 473-80.
83. Elsasser, S., et al., *Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(10): p. 3263-77.
84. Chen, S. and S.P. Bell, *CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6*. Genes Dev, 2011. **25**(4): p. 363-72.
85. Nishitani, H., et al., *Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1126-36.
86. McGarry, T.J. and M.W. Kirschner, *Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1043-53.
87. Fujita, M., et al., *Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25927-32.

88. Nguyen, V.Q., C. Co, and J.J. Li, *Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms*. *Nature*, 2001. **411**(6841): p. 1068-73.
89. Nishitani, H. and P. Nurse, *p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast*. *Cell*, 1995. **83**(3): p. 397-405.
90. Gopalakrishnan, V., et al., *Redundant control of rereplication in fission yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(23): p. 13114-9.
91. Nishitani, H., et al., *The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 625-8.
92. Yanow, S.K., Z. Lygerou, and P. Nurse, *Expression of Cdc18/Cdc6 and Cdt1 during G2 phase induces initiation of DNA replication*. *EMBO J*, 2001. **20**(17): p. 4648-56.
93. Kiang, L., et al., *Specific replication origins promote DNA amplification in fission yeast*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 18): p. 3047-51.
94. Mickle, K.L., et al., *Checkpoint effects and telomere amplification during DNA re-replication in fission yeast*. *BMC Mol Biol*, 2007. **8**: p. 119.
95. Tanny, R.E., et al., *Genome-wide analysis of re-replication reveals inhibitory controls that target multiple stages of replication initiation*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(5): p. 2415-23.
96. Melixetian, M., et al., *Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53*. *J Cell Biol*, 2004. **165**(4): p. 473-82.
97. Tada, S., et al., *Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(2): p. 107-13.
98. Dorn, E.S., et al., *Analysis of re-replication from deregulated origin licensing by DNA fiber spreading*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(1): p. 60-9.
99. Vaziri, C., et al., *A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication*. *Mol Cell*, 2003. **11**(4): p. 997-1008.
100. Diril, M.K., et al., *Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(10): p. 3826-31.
101. Zhu, W., et al., *An image-based, high-throughput screening assay for molecules that induce excess DNA replication in human cancer cells*. *Mol Cancer Res*, 2011. **9**(3): p. 294-310.
102. Lee, C.Y., et al., *High-throughput screening for genes that prevent excess DNA replication in human cells and for molecules that inhibit them*. *Methods*, 2012. **57**(2): p. 234-48.
103. Maiorano, D., et al., *Recombinant Cdt1 induces rereplication of G2 nuclei in Xenopus egg extracts*. *Curr Biol*, 2005. **15**(2): p. 146-53.

104. Teer, J.K. and A. Dutta, *Human Cdt1 lacking the evolutionarily conserved region that interacts with MCM2-7 is capable of inducing re-replication*. J Biol Chem, 2008. **283**(11): p. 6817-25.
105. Davidson, I.F., A. Li, and J.J. Blow, *Deregulated replication licensing causes DNA fragmentation consistent with head-to-tail fork collision*. Mol Cell, 2006. **24**(3): p. 433-43.
106. Blow, J.J. and P.J. Gillespie, *Replication licensing and cancer--a fatal entanglement?* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(10): p. 799-806.
107. Tatsumi, Y., et al., *Deregulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 15): p. 3128-40.
108. Liu, E., et al., *The ATR-mediated S phase checkpoint prevents rereplication in mammalian cells when licensing control is disrupted*. J Cell Biol, 2007. **179**(4): p. 643-57.
109. Stucki, M., et al., *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-26.
110. Lukas, C., et al., *Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention*. EMBO J, 2004. **23**(13): p. 2674-83.
111. Stucki, M. and S.P. Jackson, *gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(5): p. 534-43.
112. Bartek, J. and J. Lukas, *DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 238-45.
113. Lee, A.Y., E. Liu, and X. Wu, *The Mre11/Rad50/Nbs1 complex plays an important role in the prevention of DNA rereplication in mammalian cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32243-55.
114. Archambault, V., et al., *Disruption of mechanisms that prevent rereplication triggers a DNA damage response*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6707-21.
115. Karakaidos, P., et al., *Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability--evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1*. Am J Pathol, 2004. **165**(4): p. 1351-65.
116. Liontos, M., et al., *Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10899-909.

117. Pinyol, M., et al., *Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability*. Int J Cancer, 2006. **119**(12): p. 2768-74.
118. Yoshida, K. and I. Inoue, *Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors*. Oncogene, 2004. **23**(21): p. 3802-12.
119. Tower, J., *Developmental gene amplification and origin regulation*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 273-304.
120. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
121. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
122. Malchers, F., et al., *Mechanisms of Primary Drug Resistance in FGFR1-Amplified Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(18): p. 5527-5536.
123. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
124. Alt, F.W., et al., *Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells*. J Biol Chem, 1978. **253**(5): p. 1357-70.
125. Wahl, G.M., R.A. Padgett, and G.R. Stark, *Gene amplification causes overproduction of the first three enzymes of UMP synthesis in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-resistant hamster cells*. J Biol Chem, 1979. **254**(17): p. 8679-89.
126. Mondello, C., A. Smirnova, and E. Giulotto, *Gene amplification, radiation sensitivity and DNA double-strand breaks*. Mutat Res, 2010. **704**(1-3): p. 29-37.
127. Albertson, D.G., *Gene amplification in cancer*. Trends Genet, 2006. **22**(8): p. 447-55.
128. Savelyeva, L. and M. Schwab, *Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application*. Cancer Lett, 2001. **167**(2): p. 115-23.
129. Vogt, N., et al., *Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11368-73.
130. Kuwahara, Y., et al., *Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **41**(2): p. 125-32.

131. Meeker, A.K., et al., *Telomere shortening occurs in subsets of normal breast epithelium as well as in situ and invasive carcinoma*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 925-35.
132. Meeker, A.K., et al., *Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6405-9.
133. Gisselsson, D., et al., *Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres*. Br J Cancer, 2002. **87**(2): p. 202-7.
134. Gisselsson, D., et al., *Telomere-mediated mitotic disturbances in immortalized ovarian epithelial cells reproduce chromosomal losses and breakpoints from ovarian carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(1): p. 22-33.
135. Brodeur, G.M., et al., *Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines*. Cancer Res, 1981. **41**(11 Pt 1): p. 4678-86.
136. Matsui, A., et al., *Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer*. Biomol Concepts, 2013. **4**(6): p. 567-82.
137. Green, B.M., K.J. Finn, and J.J. Li, *Loss of DNA replication control is a potent inducer of gene amplification*. Science, 2010. **329**(5994): p. 943-6.
138. Finn, K.J. and J.J. Li, *Single-stranded annealing induced by re-initiation of replication origins provides a novel and efficient mechanism for generating copy number expansion via non-allelic homologous recombination*. PLoS Genet, 2013. **9**(1): p. e1003192.
139. McClintock, B., *The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1942. **28**(11): p. 458-63.
140. McClintock, B., *The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays*. Genetics, 1941. **26**(2): p. 234-82.
141. Marotta, M., et al., *Palindromic amplification of the ERBB2 oncogene in primary HER2-positive breast tumors*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41921.
142. Selvarajah, S., et al., *The breakage-fusion-bridge (BFB) cycle as a mechanism for generating genetic heterogeneity in osteosarcoma*. Chromosoma, 2006. **115**(6): p. 459-67.
143. Slack, A., et al., *On the mechanism of gene amplification induced under stress in Escherichia coli*. PLoS Genet, 2006. **2**(4): p. e48.
144. Ottaviani, D., M. LeCain, and D. Sheer, *The role of microhomology in genomic structural variation*. Trends Genet, 2014. **30**(3): p. 85-94.
145. Pall, M.L., *Gene-amplification model of carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2465-8.

146. Albertson, D.G., et al., *Chromosome aberrations in solid tumors*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 369-76.
147. Klein, G. and E. Klein, *Conditioned tumorigenicity of activated oncogenes*. Cancer Res, 1986. **46**(7): p. 3211-24.
148. Schwab, M. and L.C. Amler, *Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 1990. **1**(3): p. 181-93.
149. Beroukhi, R., et al., *The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers*. Nature, 2010. **463**(7283): p. 899-905.
150. Kauraniemi, P. and A. Kallioniemi, *Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 39-49.
151. Jarvinen, T.A. and E.T. Liu, *HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **78**(3): p. 299-311.
152. Tai, W., R. Mahato, and K. Cheng, *The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery*. J Control Release, 2010. **146**(3): p. 264-75.
153. Arteaga, C.L., et al., *Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **9**(1): p. 16-32.
154. Shinojima, N., et al., *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6962-70.
155. Taylor, T.E., F.B. Furnari, and W.K. Cavenee, *Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance*. Curr Cancer Drug Targets, 2012. **12**(3): p. 197-209.
156. Schwab, M., *Amplification of oncogenes in human cancer cells*. Bioessays, 1998. **20**(6): p. 473-9.
157. Musgrove, E.A., et al., *Cyclin D as a therapeutic target in cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(8): p. 558-72.
158. Santarius, T., et al., *A census of amplified and overexpressed human cancer genes*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 59-64.
159. Swanton, C., *Intratumor heterogeneity: evolution through space and time*. Cancer Res, 2012. **72**(19): p. 4875-82.
160. Mansoori, B., et al., *The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review*. Adv Pharm Bull, 2017. **7**(3): p. 339-348.
161. Johnston, R.N., S.M. Beverley, and R.T. Schimke, *Rapid spontaneous dihydrofolate reductase gene amplification shown by fluorescence-activated cell sorting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3711-5.

162. Gorre, M.E., et al., *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
163. Kohli, J. and P. Nurse, *Genetic nomenclature guide. Schizosaccharomyces pombe*. Trends Genet, 1995: p. 9-10.
164. Burke, J.D. and K.L. Gould, *Molecular cloning and characterization of the Schizosaccharomyces pombe his3 gene for use as a selectable marker*. Mol Gen Genet, 1994. **242**(2): p. 169-76.
165. Ohi, R., A. Feoktistova, and K.L. Gould, *Construction of vectors and a genomic library for use with his3-deficient strains of Schizosaccharomyces pombe*. Gene, 1996. **174**(2): p. 315-8.
166. Forsburg, S.L., *Comparison of Schizosaccharomyces pombe expression systems*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(12): p. 2955-6.
167. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
168. Ludecke, H.J., et al., *Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification*. Nature, 1989. **338**(6213): p. 348-50.
169. Zhang, L., et al., *Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5847-51.
170. Telenius, H., et al., *Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer*. Genomics, 1992. **13**(3): p. 718-25.
171. Dean, F.B., et al., *Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5261-6.
172. Huang, L., et al., *Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2015. **16**: p. 79-102.
173. Li, B. and C.N. Dewey, *RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 323.
174. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biol, 2009. **10**(3): p. R25.
175. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 621-8.

176. Trapnell, C., et al., *Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(5): p. 511-5.
177. Mermel, C.H., et al., *GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers*. Genome Biol, 2011. **12**(4): p. R41.
178. Lygeros, J., et al., *Stochastic hybrid modeling of DNA replication across a complete genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12295-300.
179. Kitamura, E., J.J. Blow, and T.U. Tanaka, *Live-cell imaging reveals replication of individual replicons in eukaryotic replication factories*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1297-308.
180. Baum, B., et al., *Cdc18 transcription and proteolysis couple S phase to passage through mitosis*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5689-98.
181. Petrova, B., et al., *Quantitative analysis of chromosome condensation in fission yeast*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(5): p. 984-98.
182. Liang, J., W. Cai, and Z. Sun, *Single-cell sequencing technologies: current and future*. J Genet Genomics, 2014. **41**(10): p. 513-28.
183. Navin, N., et al., *Tumour evolution inferred by single-cell sequencing*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 90-4.
184. Pellegrino, M., et al., *High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics*. Genome Res, 2018. **28**(9): p. 1345-1352.
185. Cooley, C., et al., *Tel1ATM dictates the replication timing of short yeast telomeres*. EMBO Rep, 2014. **15**(10): p. 1093-101.
186. Sridhar, A., S. Kedziora, and A.D. Donaldson, *At short telomeres Tel1 directs early replication and phosphorylates Rif1*. PLoS Genet, 2014. **10**(10): p. e1004691.
187. Fersht, N., et al., *Cdc18/CDC6 activates the Rad3-dependent checkpoint in the fission yeast*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(16): p. 5323-37.
188. Mahadevappa, R., et al., *The prognostic significance of Cdc6 and Cdt1 in breast cancer*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 985.
189. Neelsen, K.J., et al., *Deregulated origin licensing leads to chromosomal breaks by rereplication of a gapped DNA template*. Genes Dev, 2013. **27**(23): p. 2537-42.
190. Al-Kuraya, K., et al., *Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8534-40.

191. Blegen, H., et al., *DNA amplifications and aneuploidy, high proliferative activity and impaired cell cycle control characterize breast carcinomas with poor prognosis*. *Anal Cell Pathol*, 2003. **25**(3): p. 103-14.
192. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(5): p. 401-4.
193. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. *Sci Signal*, 2013. **6**(269): p. pl1.
194. Jurikova, M., et al., *Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer*. *Acta Histochem*, 2016. **118**(5): p. 544-52.
195. Haapala, K., et al., *Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(3): p. 474-8.
196. Uhlen, M., et al., *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(12): p. 1248-50.
197. Sugimoto, N., et al., *Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(19): p. 19691-7.
198. Petersen, B.O., et al., *Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/Cdk2 regulates its subcellular localization*. *EMBO J*, 1999. **18**(2): p. 396-410.
199. Truong, L.N., et al., *Homologous recombination is a primary pathway to repair DNA double-strand breaks generated during DNA rereplication*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(42): p. 28910-23.
200. Martina, M., et al., *Saccharomyces cerevisiae Rif1 cooperates with MRX-Sae2 in promoting DNA-end resection*. *EMBO Rep*, 2014. **15**(6): p. 695-704.
201. Sideridou, M., et al., *Cdc6 expression represses E-cadherin transcription and activates adjacent replication origins*. *J Cell Biol*, 2011. **195**(7): p. 1123-40.
202. Senga, T., et al., *PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(10): p. 6246-52.
203. Arias, E.E. and J.C. Walter, *PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(1): p. 84-90.
204. Greenblatt, M.S., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. *Cancer Res*, 1994. **54**(18): p. 4855-78.

