



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ:
«Η περίπτωση των ρετρομεταθετών στοιχείων SVA»**

**ΜΑΝΤΖΙΟΥ Κ. ΣΤΕΦΑΝΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ:
«Η περίπτωση των ρετρομεταθετών στοιχείων SVA»**

**ΜΑΝΤΖΙΟΥ Κ. ΣΤΕΦΑΝΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μάντζιου Στεφανίας: 30-3-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 658^α/7-4-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Κωλέττας Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Μοριακή Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αγγελίδης Χαράλαμπος Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-4-2009

«Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της ρετρομετάθεσης: η περίπτωση των ρετρομεταθετών στοιχείων SVA»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 786^α/29-3-2016

Αγγελίδης Χαράλαμπος	Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττας Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής-Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης,	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις **21-6-2016**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

«The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existing.

One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity,

of life, of the marvelous structure of reality.

It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day.

Never lose a holy curiosity.»

Albert Einstein

**Αφιερωμένη στην
οικογένειά μου...**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και, εν μέρει, στο Αιματολογικό εργαστήριο του Π.Π.Ν.Ι. Η επιστημονική και ερευνητική διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό την αδιάκοπη επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεόδωρου Τζαβάρα τον οποίο και ευχαριστώ θερμά που με εμπιστεύτηκε να φέρω εις πέρας το εγχείρημα αυτό, όπως για τις γερές βάσεις που με βοήθησε να θέσω σε επίπεδο θεωρητικό, πειραματικό και ηθικό. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιστημονικό υπεύθυνο του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Π.Π.Ν. Ιωαννίνων κ. Γιώργο Βαρθολομάτο για την εμπιστοσύνη που πρώτος έδειξε στο πρόσωπό μου, τη συνεχή βοήθεια, την ευγενική παροχή λευχαιμικών δειγμάτων και την άδεια χρήσης του Κυτταρομέτρου Ροής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Ευάγγελο Κωλέττα, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Βιολογίας, για την ευγενή παροχή των κυτταρικών σειρών Jurkat και Jurkat Bcl-2 και για τις συμβουλές του και τον καθηγητή κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Τους Καθηγητές κ. Ευστάθιο Φριλίγγο και κ. Ιωάννη Γεωργίου, όπως επίσης και του Αναπληρωτές Καθηγητές κα. Μαρίκα Σύρρου και κ. Παναγιώτη Κούκλη, μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Αριστοτέλη Αστρινείδη για την παροχή αντισωμάτων και τις συμβουλές του στα πειράματα αυτοφαγίας.

Έχοντας γνώση ότι ο ακρογωνιαίος λίθος κάθε επιστημονικής προσπάθειας είναι η συνεργασία, θέλω να ευχαριστήσω τους συνεργάτες και φίλους τόσο της ερευνητικής ομάδας του κ. Θεόδωρου Τζαβάρα αλλά και του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας. Ιδιαίτερω, ευχαριστώ το Δρ. Γεώργιο Μαρκόπουλο για την υπομονή, την πίστη, την πολύτιμη και καθοριστική βοήθειά του σε πειραματικό αλλά και σε θεωρητικό επίπεδο. Τη Δρ. Γιώτα Κασιούμη, τη Δρ. Φωτεινή Γκάρτζιου, και τον Δρ. Δημήτρη Νουτσόπουλο για την άριστη συνεργασία, τη βοήθεια και τις εποικοδομητικές συζητήσεις και συμβουλές. Τη Δρ. Βιολέττα Μαλταμπέ, τη Μαρία-Αγγελική Βλάικου, την Ευγενία Ρουπακιά, το Βασίλη Βλαντό, την Ιωάννα Τσίτσαρη, τη Ζωή Παπαδοπούλου για την υποστήριξη, τη φιλία, τις συζητήσεις μας και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο. Ένα ευχαριστώ για τη συνεργασία οφείλω στη Λευκοθέα Ντόβα, τον Αχιλλέα Καραμούτσιο και τη Σωτηρία Θρασυβούλου.

Ολοκληρώνοντας αυτό το μακρύ ταξίδι γεμάτο εμπειρίες, που με δίδαξαν πολλά, έχω την ευκαιρία να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου εκτός από τους φίλους και συνεργάτες στο χώρο του εργαστηρίου, στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και έβρισκαν πάντα τον τρόπο να με κάνουν να χαμογελώ και να συνεχίζω την προσπάθεια. Γιώργο μου, με έμαθες να πιστεύω στον εαυτό μου και να μην επαναπαύομαι. Σοφούλα, Ράνια, Φωτεινούλα, Γιώτα, Ελένη, Εύη, Πελαγίτσα σας αγαπώ πολύ και σας ευχαριστώ απ' την καρδιά μου! Η διατριβή αυτή είναι αφιερωμένη στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Βασιλική, που με την αγάπη και τη συνεχή υποστήριξή τους στήριζαν και στηρίζουν τις επιλογές μου, χαρίζοντας γερά φτερά στα όνειρά μου!

Ιωάννινα, Ιούνιος 2016

Μάντζιου Κ. Στεφανία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	Περί μεταθετών στοιχείων	7
1.2	Ταξινόμηση μεταθετών στοιχείων	8
1.3	Ρετρομεταθετά στοιχεία	9
1.3.1	<i>LTR</i> ρετρομεταθετά στοιχεία (ή <i>LTR</i> ρετροτρανσποζόνια)	9
1.3.2	Μη φέροντα <i>LTR</i> ρετρομεταθετά στοιχεία (ή μη φέροντα <i>LTR</i> ρετροτρανσποζόνια)	11
	<i>α. LINEs</i>	11
	<i>β. SINEs (Alu)</i>	12
	<i>γ. SVA (SINE-R/VNTR/Alu)</i>	13
1.4	Η οικογένεια των σύνθετων ρετρομεταθετών στοιχείων SVA	14
1.4.1	<i>Η δομή των SVA</i>	14
1.4.2	<i>Υποοικογένειες SVA – Εξελικτικά στοιχεία</i>	15
1.5	Μεταγραφή και ρετρομετάθεση των SVA	18
1.5.1	<i>Ρύθμιση της μεταγραφής των SVA</i>	18
1.5.2	<i>Το μοντέλο ρετρομετάθεσης των SVA</i>	21
1.6	Ο αντίκτυπος των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γένωμα	23
1.6.1	<i>Ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης</i>	26
1.6.2	<i>Αντι-νοηματικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές</i>	27
1.6.3	<i>Σημεία εναλλακτικού ματίσματος</i>	28
1.6.4	<i>Παροχές σημάτων πολυαδενυλίωσης</i>	30
1.6.5	<i>Σπασίματα διπλής έλικας DNA</i>	30
1.6.6	<i>Τα μεταθετά στοιχεία ως παράγοντες ανασυνδυασμού</i>	31
1.6.7	<i>Μεταγωγή εκατέρωθεν αλληλουχιών</i>	31
1.6.8	<i>Εισαγωγή θέσεων μεθυλίωσης</i>	32
1.7	Ασθένειες που συσχετίζονται με τα ρετρομεταθετά στοιχεία SVA	34
1.8	Κυτταρικοί μηχανισμοί αποσιώπησης των μεταθετών στοιχείων	37
1.9	Κυτταρική ομοίωση και αυτοφαγία	38
1.9.1	<i>Ο ρόλος της πρωτεΐνης LC3</i>	39
1.9.2	<i>Ο ρόλος της πρωτεΐνης p62</i>	40
1.9.3	<i>Ο ρόλος της κινάσης S6K και του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR</i>	41
1.10	Παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου	42
1.10.1	<i>Υπεροξειδίο του υδρογόνου</i>	42
1.10.2	<i>Το βαρύ μέταλλο Αρσενικό</i>	43
1.11	Παράγοντες που επιδρούν στην επιγενετική κατάσταση του γενώματος	45
1.11.1	<i>5' Δεοξυ-αζακυτιδίνη</i>	45

1.11.2	<i>Βαλπροϊκό οξύ</i>	46
1.11.3	<i>Ετοποσίδιο</i>	46
1.12	Σημαντικοί δείκτες κυτταρικής διαφοροποίησης	48
1.12.1	<i>Το αντιγόνο CD133 ως δείκτης καρκινικών βλαστικών κυττάρων</i> ...	48
1.12.2	<i>Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox-2</i>	49
1.12.3	<i>Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4</i>	49
1.13	Κατηγοριοποίηση λευχαιμών	51
1.13.1	<i>Βασικά χαρακτηριστικά οξείας λευχαιμίας</i>	52
1.13.2	<i>Βασικά χαρακτηριστικά χρόνιας λευχαιμίας</i>	53
1.13.3	<i>Λευχαιμία και ρετρομεταθετά στοιχεία</i>	53
1.14	Χαρακτηριστικά του γονιδίου SMOC-1	54
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	57
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1	Γενικά υλικά	59
2.1.1	<i>Αναλώσιμα</i>	59
2.1.2	<i>Λοιπά αντιδραστήρια</i>	59
2.1.3	<i>Εξοπλισμός</i>	59
2.1.4	<i>Διαλύματα αντιδραστηρίων</i>	60
2.1.5	<i>Υλικά καλλιέργειας βακτηρίων</i>	61
	<i>α. Θρεπτικά υλικά</i>	61
	<i>β. Αντιβιοτικά</i>	61
2.1.6	<i>Υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων</i>	61
	<i>α. Θρεπτικά υλικά</i>	61
	<i>β. Διάλυμα έκπλυσης</i>	62
	<i>γ. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA</i>	62
2.2	Τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA	62
2.2.1	<i>Βακτηριακά στελέχη</i>	62
2.2.2	<i>Βακτηριακός μετασχηματισμός</i>	63
	<i>α. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών μετασχηματισμού MC1061</i>	63
	<i>β. Βακτηριακός μετασχηματισμός (εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα)</i>	63
2.2.3	<i>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας</i>	64
	<i>α. Μέσω λυσοζύμης και βρασμού</i>	64
	<i>β. Μέσω στηλών</i>	65
2.2.4	<i>Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας</i>	65
2.2.5	<i>Ηλεκτροφόρηση</i>	66
2.2.6	<i>Απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης</i>	67
2.2.7	<i>Καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα</i>	67
2.2.8	<i>Κατασκευή ανασυνδυσμένων μορίων DNA – Κλωνοποίηση</i>	67
	<i>α. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες</i>	68

	β. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης	68
	γ. Αντίδραση συνένωσης με DNA λιγάση	69
2.2.9	Κατασκευή του πλασμιδίου pBluescript-HygroB/SVSMOCL/EGFP-INT	70
2.3	Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	72
2.3.1	Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές	73
2.3.2	Επανακαλλιέργεια κυττάρων	74
2.3.3	Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	75
2.3.4	Αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο	75
2.3.5	Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (transfection)	76
	α. Μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)	76
	β. Μέσω λιπιδίων	76
2.3.6	Μικροσκοπία φθορισμού	77
2.3.7	Εξέταση κυττάρων για ικανότητα σχηματισμού εστιών σε μέσο αραρόζης (anchorage-independent foci)	77
2.3.8	Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCA DP-XCelligence	78
2.4	Ανάλυση DNA	79
2.4.1	Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA για ανάλυση PCR	79
2.4.2	Ποσοτικοποίηση DNA	80
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	81
2.4.4	Απομόνωση RNA	83
2.4.5	Παρασκευή cDNA	84
2.4.6	Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας – Διαδικτυακές βάσεις δεδομένων	85
2.5	Ανάλυση πρωτεϊνών	86
2.5.1	Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)	86
	α. Παρασκευή εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών από <i>in vitro</i> κυτταροκαλλιέργεια	86
	β. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	87
	γ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	87
	δ. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	88
	ε. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking) – Επώσεις με αντισώματα	89
	στ. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)	89
	ζ. Αντισώματα	90
2.6	Κυτταρομετρία Ροής (FACS)	90
2.6.1	Μέτρηση συχνότητας ρετρομετάθεσης	91
2.6.2	Ανίχνευση επιφανειακών δεικτών μέσω άμεσου ανοσοφθορισμού και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής	92
2.6.3	Κυτταρικός κύκλος	92

3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1	Βιοπληροφορική ανάλυση των SVA	95
3.2	Απομόνωση ενός πλήρους μήκους SVA	100
3.2.1	<i>Ανάλυση έκφρασης RNA των SVA σε ανθρώπινες λευχαιμίες</i>	100
3.2.2	<i>Περιγραφή περιστατικού οξείας λευχαιμίας B-κυτταρικής σειράς</i>	103
3.2.3	<i>Κλωνοποίηση του στοιχείου SVA που εδράζεται στο γονίδιο SMOC-1</i>	106
3.2.4	<i>Ανάλυση του προφίλ μεθυλίωσης του SVA_{SMOC1-L}</i>	107
3.2.5	<i>Εξέταση λευχαιμικών δειγμάτων ως προς την έλλειψη των 347 ζευγών βάσεων</i>	109
3.3	Σήμανση του ρετροτρανσποζονίου SVA_{SMOC1-L} με κασέτα ανίχνευσης ρετρομετάθεσης	111
3.4	Έλεγχος τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης SVA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	113
3.4.1	<i>Έλεγχος απόδοσης των συνθηκών ηλεκτροδιάτρησης</i>	113
3.4.2	<i>Διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων τραχήλου μήτρας (HeLa) και επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (A549, H1299)</i>	114
3.4.3	<i>Ρετρομεταθετικά γεγονότα σε κύτταρα HeLa</i>	117
3.4.4	<i>Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω PCR</i>	118
3.5	Ρετρομεταθετικά γεγονότα SVA_{SMOC1-L} σε λευχαιμικά κύτταρα	119
3.5.1	<i>Διαμόλυνση σε λευχαιμικά T-λεμφοκύτταρα Jurkat</i>	119
3.5.2	<i>Διαμόλυνση σε λευχαιμικά T-λεμφοκύτταρα HUT-78</i>	121
3.6	Ρετρομεταθετικά γεγονότα σε κύτταρα A549	123
3.6.1	<i>Η περίπτωση ενός κλώνου A549 με υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης</i>	126
3.6.2	<i>Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα έχουν την ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά μέσα και χαρακτηρίζονται από αυξημένο μεταστατικό δυναμικό</i>	130
3.7	Έλεγχος συσχέτισης της υψηλής συχνότητας ρετρομετάθεσης με φαινόμενα αυτοφαγίας	133
3.8	Ο ρόλος της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροτρανσποζονίων L1 στην κινητοποίηση του SVA_{SMOC1-L}	135
3.9	Ρύθμιση της ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOC1-L} από επιγενετικούς παράγοντες	136
3.9.1	<i>Η επίδραση της Τριχοστατίνης A</i>	136
3.9.2	<i>Η επίδραση της Δεοξυ-5'-αζακυτιδίνης</i>	139
3.10	Ρύθμιση της ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOC1-L} από το αντικαρκινικό φάρμακο Ετοποσίδιο	141
3.11	Ρύθμιση της ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOC1-L} από οξειδωτικό στρες	143
3.11.1	<i>Η επίδραση του βαρέως μετάλλου Αρσενικού</i>	143
3.11.2	<i>Η επίδραση του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου</i>	146
3.11.3	<i>Η επίδραση του Βαλπροϊκού οξέος</i>	149

4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1	Βιοπληροφορική ανάλυση των SVA	151
4.2	Ανάλυση μεταγραφής SVA σε λευχαιμικούς ασθενείς	153
4.3	Ιδιαιτερότητα ενός περιστατικού λευχαιμίας B-λεμφοκυτταρικής σειράς & απομόνωση ενός ελλειμματικού SVA	154
4.4	Κατασκευή του ανασυνδυσμένου SVAS _{SMOC-1L} /EGFP-INT και έλεγχος παραγωγής γεγονότων ρετρομετάθεσης	156
4.5	Κυτταρικές επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης SVAS _{SMOC-1L} σε κλώνους A549	159
	4.5.1 Γενικές παρατηρήσεις	159
	4.5.2 Η ρετρομετάθεση SVA επάγει φαινόμενα αυτοφαγίας	160
	4.5.3 Αυξημένα γεγονότα ρετρομετάθεσης σχετίζονται με εμφάνιση ιδιοτήτων καρκινικών βλαστικών κυττάρων	162
4.6	Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες & του αντικαρκινικού φαρμάκου Ετοποσίδιο στη ρετρομετάθεση του SVAS _{SMOC1-L}	164
4.7	Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στη ρετρομετάθεση του SVAS _{SMOC1-L}	167
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	171
	ABSTRACT	173
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	175

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

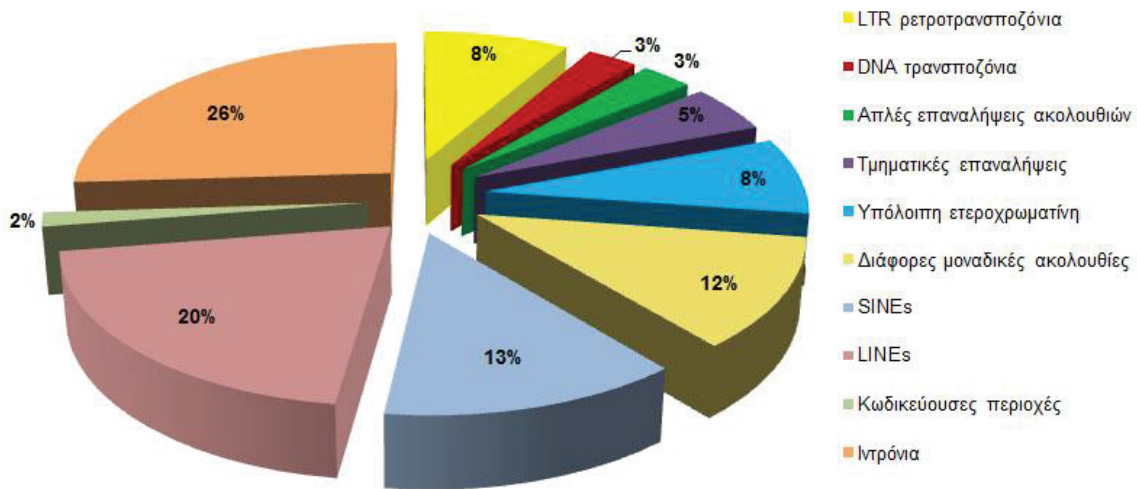
1.1 Περί μεταθετών στοιχείων

Αν κάποιος εξαιρέσει τον Αριστοτέλη, ο οποίος πρότεινε ότι τα κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά βρίσκονται στο αίμα των ανθρώπων, ο Μέντελ ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε τους «κληρονομικούς παράγοντες» (γονίδια). Σχεδόν έναν αιώνα μετά, η καταγραφή και επεξεργασία της αλληλουχίας του γενετικού υλικού πολλών οργανισμών, αναδιαμόρφωσε την επικρατούσα αντίληψη «περί γονιδίου» και αποκάλυψε τη σημαντική επίδραση των τρανσποζονίων στη σύνθεση, διαμόρφωση και εξέλιξη του γενώματος. Οι όροι «εγωιστικό» και «άχρηστο» DNA (1) που χρησιμοποιήθηκαν από τον Francis Crick το 1980, αντικαταστάθηκαν από την παραδοχή ότι ο ρόλος των τρανσποζονίων είναι διττός: ενέχονται στην πρόκληση ασθενειών αλλά αποτελούν παράλληλα έναν δυναμικό, απαραίτητο μηχανισμό κυτταρικής προσαρμογής.

Ο όρος μεταθετά στοιχεία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τη Barbara McClintock η οποία και τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας/Ιατρικής, για την ανακάλυψή τους το 1983 (2). Η έρευνά της αφορούσε τη μελέτη του χρωματικού μωσαϊκισμού στον αραβόσιτο και οδήγησε στην περιγραφή των στοιχείων Ενεργοποιητών (Ac - Activator)) και Διαχωρισμού (Ds - Dissociation). Τα στοιχεία αυτά τα ονόμασε «στοιχεία ελέγχου» λόγω της ιδιότητας που έχουν να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, μεταπηδώντας στο γένωμα (3). Αν και η ανταπόκριση της επιστημονικής κοινότητας στην εργασία της ήταν αρχικά επιφυλακτική, η ανακάλυψη παρόμοιων στοιχείων στις μύγες, τα βακτήρια και τους ζυμομύκητες υπογράμμισαν τη σημασία της.

Όσο αφορά το ανθρώπινο γένωμα, τα 3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων που συναντώνται σε ένα απλοειδές κύτταρό του είναι κατά συντριπτική πλειοψηφία μη κωδικοποιά και τα περισσότερα είναι αναγνωρίσιμα ως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Οι πιο πολλές από τις επαναλήψεις είναι διάσπαρτες, που σημαίνει ότι απαντώνται ασυνεχώς ως μεμονωμένα διάσπαρτα αντίγραφα στο γένωμα. Μέχρι προσφάτως ήταν γνωστό ότι το ανθρώπινο γένωμα απαρτίζεται περίπου κατά το ήμισυ από μεταθετά στοιχεία (4) (*Εικ.1.1*). Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι τα

μεταθετά στοιχεία αποτελούν στην πραγματικότητα μεγαλύτερο ποσοστό του γενώματος που αγγίζει το 75% (5).



Εικόνα 1.1: Κατανομή αλληλουχιών DNA στο ανθρώπινο γένομα. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει διαφορετική κατηγορία αλληλουχιών. Το επαναλαμβανόμενο DNA συνιστά περίπου το ήμισυ του συνόλου των αλληλουχιών.

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα σημαντικών παρατηρήσεων και μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί από πολυάριθμες ερευνητικές ομάδες, υπογραμμίζουν ότι τα γενώματα έχουν συνεξελιχθεί με τα μεταθετά στοιχεία που περιλαμβάνουν. Έχουν, μάλιστα, «επινοήσει» στρατηγικές ώστε, όχι μόνο να αποτρέψουν την επιβλαβή δράση τους αλλά και να αξιοποιήσουν τις αλληλουχίες αυτές προς όφελός τους. Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να συμβάλλουν στην εξέλιξη του γενώματος και να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση μετατρέπόμενα κατά αυτό τον τρόπο από «άχρηστες» αλληλουχίες σε πραγματικό θησαυρό.

1.2 Ταξινόμηση Μεταθετών Στοιχείων

Η ταξινόμηση των μεταθετών στοιχείων μπορεί να γίνει σε δύο βασικές κατηγορίες: **α.** στα DNA μεταθετά στοιχεία ή DNA τρανσποζόνια, που μετατίθενται μέσω αποκοπής και νέας ενσωμάτωσης ως DNA αντίγραφα (μηχανισμός «cut and paste») και **β.** στα ρετρομεταθετά στοιχεία ή ρετροτρανσποζόνια επειδή ο τρόπος συμπεριφοράς τους είναι ανάλογος των ρετροϊών. Τα τελευταία μετατίθενται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου RNA που μεταγράφεται αντίστροφα προς cDNA και ενσωματώνεται σε μια νέα θέση του γενώματος (μηχανισμός «copy and paste») (6).

Επιπλέον, τα μεταθετά στοιχεία διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα βάσει του αν κωδικεύουν ή όχι, αντίστοιχα, τα απαραίτητα για τη μετάθεσή τους ένζυμα. Στη δεύτερη περίπτωση όπου τα μη αυτόνομα μεταθετά στοιχεία στερούνται των απαραίτητων αλληλουχιών, η μετάθεσή τους μπορεί να καταστεί εφικτή μέσω ενζύμων που κωδικεύονται από ομόλογα αυτόνομα στοιχεία (7).

1.2 Ρετρομεταθετά στοιχεία

Στο γονιδίωμα όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών, από τις ζύμες μέχρι και τον άνθρωπο, υπάρχουν ρετρομεταθετά στοιχεία που διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες (8): **α.** στα LTR ή ιικού τύπου ρετροτρανσποζόνια, τα οποία φέρουν μακρές τερματικές επαναλήψεις (LTRs: Long Terminal Repeats) και **β.** στα μη φέροντα LTR ρετροτρανσποζόνια τα οποία έχουν μια πολυαδενυλική αλληλουχία στο 3' άκρο. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι ότι για τη μετάθεσή τους απαιτείται ένα ενδιάμεσο μόριο RNA, το οποίο υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή και ενσωματώνεται σε μία νέα θέση στο γένωμα. Αυτός ο μηχανισμός αντιγραφής και ενσωμάτωσής τους επιτρέπει τη συνεχή αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους στα ευκαρυωτικά γενώματα.

1.3.1 LTR ρετρομεταθετά στοιχεία (ή LTR ρετροτρανσποζόνια)

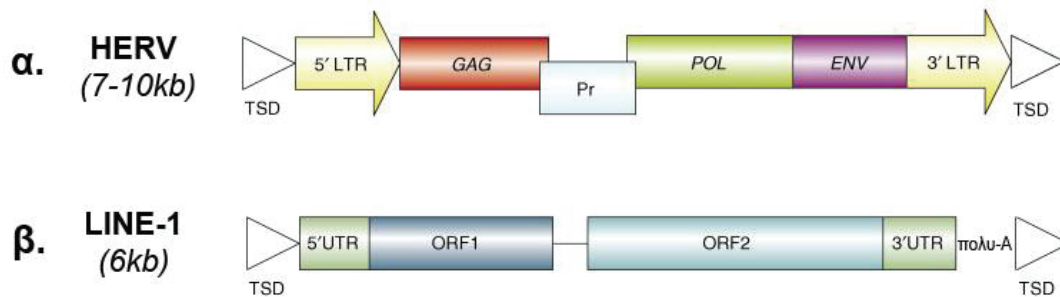
Τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία υπάρχουν στους μύκητες (π.χ. Ty στοιχεία), τη *Drosophila* (στοιχεία Copia) και απαντώνται σε υψηλά ποσοστά στα θηλαστικά αποτελώντας το 8% του ανθρώπινου γενώματος. Στον ποντικό, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα στοιχεία VL30 που απαρτίζονται από 150-200 μέλη. Τα VL30 είναι ικανά να υποστούν αντίστροφη μεταγραφή και να μεταφερθούν σε ετερόλογα κύτταρα μέσω ψευδοϊικών σωματίων (9). Ειδικότερα, στον άνθρωπο, τα πιο συχνά συναντώμενα μέλη αυτής της κατηγορίας είναι οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί ή αλλιώς HERV (Human Endogenous Retroviruses) (10). Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 443.000 ενδογενείς ρετροϊοί και οι περισσότεροι από αυτούς σχηματίστηκαν μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού των LTR τους.

Η δομή των HERV και γενικά των LTR ρετροτρανσποζονίων, ομοιάζει με εκείνη των τυπικών προϊόν. Φέρουν δυο πανομοιότυπες μακρές τερματικές

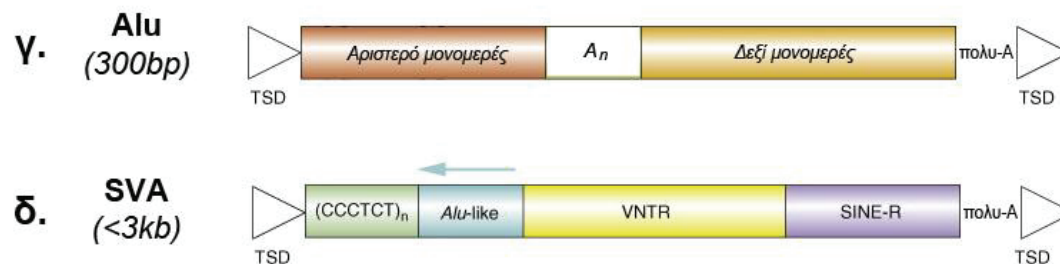
επαναλήψεις (LTRs) μήκους 300-1000 bp που βρίσκονται εκατέρωθεν τεσσάρων γονιδίων: του gag που κωδικεύει τις ικές πυρηνικές πρωτεΐνες, του pro που κωδικεύει την ιική πρωτεάση, του pol που κωδικεύει τα ιικά ένζυμα - συμπεριλαμβανομένης της αντίστροφης μεταγραφάσης - και του env που κωδικεύει τις δομικές γλυκοπρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου (8). Το γονίδιο env είναι παρόν σε ορισμένες μόνο τάξεις LTR ρετρομεταθετών στοιχείων όπως για παράδειγμα οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί HERV-K (9). Κάθε LTR χωρίζεται σε τρία μέρη: το U3, μια επανάληψη R (15-250 νουκλεοτιδίων) και το U5 (11, 12). Το μήκος των ενδογενών ρετροϊών κυμαίνεται από 7-9 kb (7) (Εικ. 1.2 α).

ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

Αυτόνομα



Μη Αυτόνομα



Εικόνα 1.2: Δομή ανθρώπινων αυτόνομων και μη- ρετρομεταθετών στοιχείων. Απεικονίζεται η δομή τεσσάρων τάξεων ενεργών ανθρώπινων ρετροτρανσποζονίων. LTR: μακρές τερματικές επαναλήψεις, TSD: διπλασιασμοί αλληλουχίας στόχου, RT: αντίστροφη μεταγραφάση, INT: ιντεγκράση, EN: ενδονουκλεάση, UTR: αμετάφραστη περιοχή, VNTR: μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων. Τροποποιημένη από (13).

Επιπρόσθετα, σημαντικά δομικά στοιχεία των LTR στοιχείων είναι αλληλουχίες απαραίτητες για την αντίστροφη μεταγραφή, όπως η θέση πρόσδεσης εκκινήτη (Primer Binding Site - PBS), το σήμα καψιδίωσης ψ και η αλληλουχία PPT

(*Polypurine Tract*). Τέλος, η θέση του κάθε στοιχείου στο γένωμα οριοθετείται από διπλασιασμούς της θέσης στόχου (*Target Site Duplications - TSDs*), μεγέθους συνήθως 4-6 bp.

1.3.2 Μη LTR ρετρομεταθετά στοιχεία (ή μη LTR ρετροτρανσποζόνια)

Η εμφάνιση των ρετροτρανσποζονίων χωρίς LTR συμπίπτει με τους πρώιμους πολυκύτταρους οργανισμούς και οι 15 γενεαλογικοί κλάδοι τους έχουν τις απαρχές τους 600 εκατομμύρια χρόνια πριν (14). Αντιπροσωπεύουν την πιο διαδεδομένη κατηγορία ρετροτρανσποζονίων στα θηλαστικά αποτελώντας το 35% του γενώματος του ανθρώπου. Χωρίζονται στα LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements - μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία), τα SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements - βραχεία διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία) και τα σύνθετα ρετροτρανσποζόνια SVA (SINE-R, VNTR, Alu).

α. LINEs

Τα LINEs αποτελούν τα πιο καλά χαρακτηρισμένα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία (15). Η έρευνά τους πήρε διαστάσεις έπειτα από την ανακάλυψη δύο de νονο ενθέσεων στοιχείων L1 στο γονίδιο του παράγοντα πήξεως του αίματος VIII σε ασθενείς με αιμορροφιλία A (16). Η μελέτη αυτή αποτέλεσε σημαντικό σταθμό για τα μεταθετά στοιχεία καθώς κίνησε το ενδιαφέρον στην έρευνα της βιολογίας των L1 και του επαναλαμβανόμενου DNA γενικότερα.

Στο ανθρώπινο DNA συναντώνται τρεις οικογένειες LINEs με παρόμοιο μηχανισμό μετάθεσης, αλλά διαφορές στην αλληλουχία τους: τα L1, L2 και L3. Από αυτά μόνο τα L1 θεωρούνται ενεργά με ικανότητα μετάθεσης. Υπάρχουν περίπου 500.000 αντίγραφα των L1 στον άνθρωπο, αποτελώντας το 18% του γενώματός του. Στα τελευταία 25 εκατομμύρια χρόνια η αριθμητική επέκτασή τους επιβραδύνθηκε και οι περισσότερες ενθέσεις αποτελούν «μοριακά απολιθώματα», κολοβωμένα, ανακαταταγμένα ή μεταλλαγμένα αντίγραφα, ανίκανα για περαιτέρω ρετρομετάθεση. Τα L1 είναι επίσης υπεύθυνα για τη δημιουργία 8000 ψευδογονιδίων. Μόνο 3.000-5.000 στοιχεία είναι πλήρους μήκους, και μόνο 80 με 100 L1 είναι ρετρομεταθετικά ενεργά (7). Περίπου το 85% των L1 ενθέσεων που προκαλούν ανθρώπινες ασθένειες προέρχεται από το υποσύνολο των ενεργών L1 (17).

Ένα στοιχείο L1 πλήρους μήκους έχει μέγεθος 6 kb και φέρει μια 5' αμετάφραστη περιοχή μήκους 900 νουκλεοτιδίων που λειτουργεί σαν εσωτερικός υποκινητής, δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF1 και ORF2) και μια μικρότερη 3' αμετάφραστη περιοχή που καταλήγει σε μια πολυ-A ουρά. Η περιοχή ORF2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 150 kDa ανάλογη της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών που έχει και δραστικότητα ενδονουκλεάσης (18). Περισσότερη προσοχή έχει δοθεί στην πρωτεΐνη ORF1p η οποία είναι 40 kDa, εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό και είναι ευκολότερο να μελετηθεί. Δημιουργεί τριμερή σύμπλοκα και κατέχει δραστικότητα μοριακού συνοδού νουκλεϊκών οξέων (19, 20). Έχει ανιχνευτεί στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα καρκινικών και γαμετικών κυττάρων και έχει απομονωθεί από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια μαζί με το RNA των L1 και την πρωτεΐνη ORF2 (Εικ. 1.2 β).

Τα ρετροτρανσποζόνια L1 εντίθενται στο γένωμα μέσω ενός πιθανού μηχανισμού (7) που αναφέρεται ως αντίστροφη μεταγραφή πριμοδοτούμενη από την αλληλουχία στόχο (*Target Primed Reverse Transcription - TPRT*) (21-23). Κατά τη διαδικασία αυτή η ενδονουκλεάση των L1 δημιουργεί μια σχάση στο DNA σε ένα μοτίβο 5'-TTTT/AA-3' (24). Το προκύπτον 3'-OH ενώνεται με την ουρά πολύ-A και μέσω της δράσης αντίστροφης μεταγραφάσης δημιουργείται μια αλυσίδα DNA από το RNA του L1 (25). Ακολουθεί τομή του δεύτερου κλώνου και σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Λόγω των μονόκλωνων σπασιμάτων που δημιουργεί η ενδονουκλεάση, η ένθεση του ρετροτρανσποζονίου συνοδεύεται από διπλασιασμούς της αλληλουχίας στόχου (*TSD = Target Site Duplications*) (26). Ο δεύτερος κλώνος φαίνεται να είναι ικανός για υβριδοποίηση εσωτερικά του L1 RNA και ξεκινά μια δεύτερη αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (*twin priming*). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αναστροφές και κολοβώματα της αλληλουχίας του L1 και να είναι υπεύθυνο για την παρουσία ενθέσεων του L1 που έχουν χάσει τμήμα της 5' περιοχής τους (27).

β. SINEs (Alu)

Στο ανθρώπινο γένωμα υπάρχουν άνω του ενός εκατομμυρίου SINEs (28). Η πλειοψηφία των 5' άκρων των SINEs προκύπτει από τη μεταγραφή μικρών κυτταρικών RNAs από την RNA πολυμεράση III. Η κυρίαρχη κατηγορία SINEs στον άνθρωπο είναι τα Alu, ενώ στο ποντίκι τα B1 και B2. Τόσο τα μεταθετά

στοιχεία Alu όσο και τα B1 παράγονται από 7SL RNA, ενώ τα μεταθετά στοιχεία B2 και η πλειοψηφία των υπόλοιπων στοιχείων SINE προκύπτουν από γονίδια tRNA (9).

Τα Alu έχουν μήκος περίπου 300 bp και αποτελούνται από δύο διακριτά μονομερή που χωρίζονται από μια εσωτερική αλληλουχία πλούσια σε A (*Εικ.1.2 γ*). Η ονομασία αυτή τους έχει αποδοθεί διότι στην αλληλουχία τους περιέχουν θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση *AluI*. Ανήκουν στα μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια, καθώς δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη για τη μετάθεσή τους. Στα πρωτεύοντα, τα στοιχεία Alu υιοθετούν το μηχανισμό μετάθεσης των L1 και οι de novo ενθέσεις τους έχουν υπερβεί εκείνες των L1. Αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ORF2 των L1 και εντίθενται σε νέες θέσεις στις οποίες και δημιουργούνται επαναλήψεις στην αλληλουχία στόχο (27).

Ευρίσκονται συχνά σε μη κωδικεύουσες περιοχές των ώριμων mRNAs και στα ιντρόνια των ετερογενών πυρηνικών RNAs (hnRNAs). Όταν ένα στοιχείο Alu εντεθεί σε ένα γονίδιο, μπορεί να δημιουργήσει νέα εξώνια παρέχοντας θέσεις αποδέκτη και δότη ματίσματος. Τα εξώνια που προκύπτουν με τον τρόπο αυτό, ματίζονται εναλλακτικά – συχνά κατά ένα ιστοειδικό πρότυπο – οδηγώντας σε ποικιλομορφία μεταγράφων. Επίσης, υπάρχει πληθώρα Alu στην 5'αμετάφραστη περιοχή των ανθρώπινων γονιδίων απ' όπου ρυθμίζουν τη μετάφραση του mRNA. Λόγω της εκθετικής αύξησης του αριθμού των αντιγράφων τους κατά την εξέλιξη χαρακτηρίζονται ως τα πλέον “επιτυχημένα” ρετρομεταθετά στοιχεία των θηλαστικών. Τα επίπεδα RNA τους σε φυσιολογικές συνθήκες είναι χαμηλά (10^3 – 10^4 μόρια ανά κύτταρο) ενώ αυξάνουν σε καταστάσεις στρεσογόνες όπως για παράδειγμα σε ιική μόλυνση, έκθεση σε κυκλοεξαμίδιο ή θερμικό σοκ και επανέρχονται μετά την ανάνηψη των κυττάρων (29, 30). Αυτή η ρύθμιση των μεταγράφων έφερε στην επιφάνεια την πιθανότητα τα Alu να επιτελούν μια ειδική λειτουργία στον κυτταρικό μεταβολισμό που απαιτείται υπό καταστάσεις στρες.

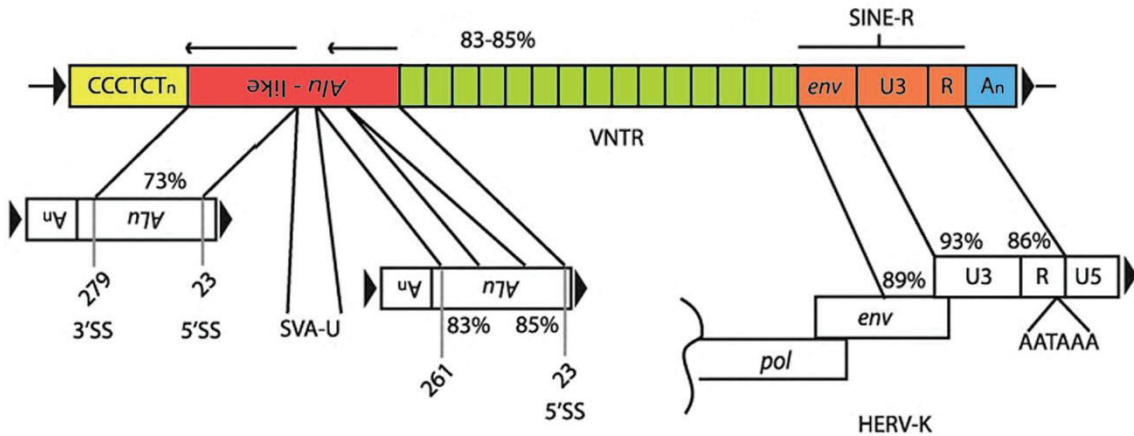
γ. SVA (SINE-R / VNTR / Alu)

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία SVA είναι σύνθετα μη LTR ρετρομεταθετά στοιχεία που οφείλουν το όνομά τους στα τρία βασικά δομικά τους στοιχεία (SINE-R, VNTR και Alu) (*Εικ.1.2 δ* και λεπτομερέστερη απεικόνιση στην *Εικ.1.3*). Περιγράφονται αναλυτικότερα στην παρακάτω Ενότητα 1.4.

1.4 Η οικογένεια των σύνθετων ρετρομεταθετών στοιχείων SVA

1.4.1 Η δομή των SVA

Τα SVA αποτελούν τη μικρότερη οικογένεια ρετροτρανσποζονίων που αριθμεί 2762 στοιχεία στην αλληλουχία του ανθρώπινου γενώματος (αποτελούν το 0.13% αυτού) από τα οποία, το 63% είναι πλήρους μήκους (31, 32). Έχουν εξελικτική ιστορία 25 εκατομμυρίων χρόνων και αποτελούν τη νεότερη υποοικογένεια ρετρομεταθετών στοιχείων στα πρωτεύοντα και στον άνθρωπο. Η συνολική γενωμική διασπορά των SVA ακολουθεί αυτή των στοιχείων Alu αν και οι νεότερες οικογένειες SVA εντοπίζονται κυρίως σε G/C-πλούσιες περιοχές ενώ οι νεότερες οικογένειες Alu σε A/T-πλούσιες περιοχές (31).



Εικόνα 1.3: Δομή ενός πλήρους μήκους ρετροτρανσποζονίου SVA. Στο σχήμα φαίνονται οι συνιστώσες του ρετρομεταθετού στοιχείου όπως και τα ποσοστά ομοιότητας με γνωστές αλληλουχίες. Όπου TSD: επαναλήψεις αλληλουχίας στόχου, VNTR: μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων

Τα SVA ξεχωρίζουν από την κατηγορία των μη φέροντων LTR ρετροτρανσποζονίων λόγω της οργάνωσής τους ως σύνθετα μεταθετά στοιχεία. Ανακαλύφθηκαν κατά τη μελέτη της δομής του γονιδίου RP (*Retinitis Pigmentosa*) (33) και ονομάστηκαν αρχικά SINE-R με το R να υποδεικνύει τη ρετροϊκή τους προέλευση. Εν συνεχεία, βρέθηκε ότι το SINE-R συνδέεται με ένα μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR: Variable Number of Tandem Repeats), με μία Alu-ομόλογη αλληλουχία και με ποικίλο αριθμό επαναλήψεων ενός εξαμερούς (CCCTCT)_n. Το εν λόγω σύνθετο ρετροτρανσποζόνιο ονομάστηκε SVA από τα αρχικά των κύριων συνιστωσών του (SINE-R, VNTR, Alu).

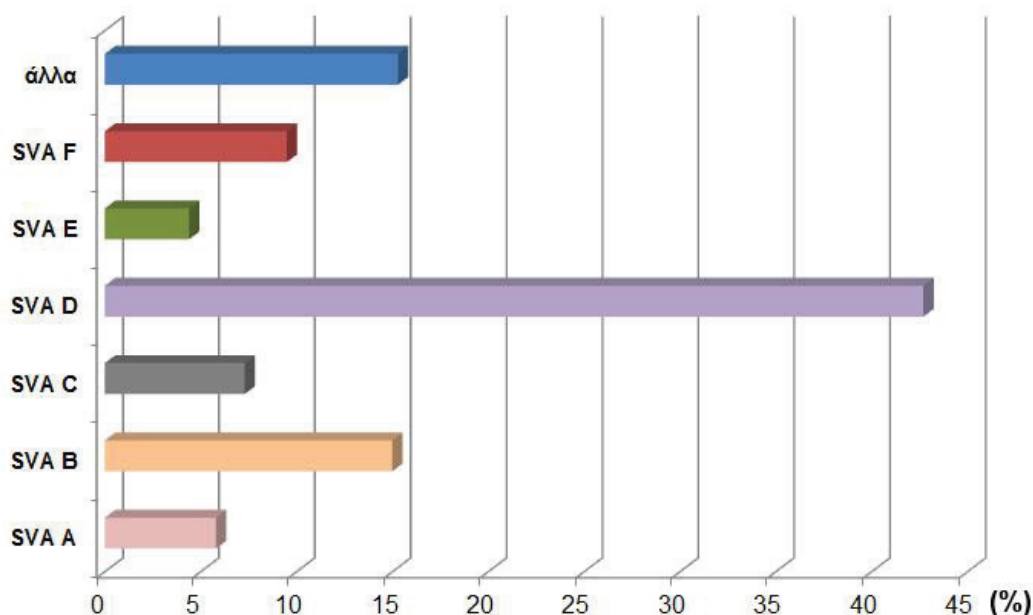
Συνολικά, ένα πλήρους μήκους στοιχείο SVA μπορεί να διακριθεί στις παρακάτω συνιστώσες (*Εικ.1.3*) (31, 34, 35):

- α.** μια περιοχή που απαρτίζεται από επαναλήψεις ενός εξαμερούς (CCCTCT)_n και εντοπίζεται στο 5' άκρο του στοιχείου
- β.** μια Alu-ομόλογη περιοχή που περιλαμβάνει δυο μη νοηματικά τμήματα Alu με προσανατολισμό «head to tail» (33, 34) και μία άγνωστη περιοχή SVA-U μήκους 31 bp. Το 5' άκρο των περισσότερων Alu της Alu-ομόλογης περιοχής είναι μήκους 255 bp και όπως προκύπτει κατά τη στοίχιση με το πρότυπο Alu της βάσης δεδομένων Repbase έχει 73% ομοιότητα στα νουκλεοτίδια 279 – 31. Το δεύτερο τμήμα Alu έχει μήκος 93 νουκλεοτίδια, περιοχή που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 261-209 και 56-23 του Alu-Repbase. Συνολικά, η περιοχή αυτή έχει μήκος περίπου 376 bp.
- γ.** ένα μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων μιας αλληλουχίας των 35-50 bp (VNTR). Το μέγεθος της περιοχής αυτής ποικίλει από 48 μέχρι και 2306 bp.
- δ.** μια αλληλουχία SINE-R περίπου 490 bp που προκύπτει από το 3' άκρο του γονιδίου *enp* και το 3' LTR του HERV-K10. Η αλληλουχία του *enp* έχει μήκος 81 νουκλεοτίδια και ομοιότητα 88% με το πρότυπο HERV-K της βάσης δεδομένων Repbase ενώ το LTR περιλαμβάνει το U3, R και το σήμα πολυαδενυλίωσης από το HERV-K10. Στο LTR εντοπίζεται και μια απαλοιφή 367 νουκλεοτιδίων.
- ε.** η παραπάνω δομή ορίζεται εκατέρωθεν από διπλασιασμούς της αλληλουχίας στη θέση στόχο (TSD: Target Site Duplications).

1.4.2 Υποοικογένειες SVA – Εξελικτικά στοιχεία

Τα SVA διακρίνονται σε 6 υποοικογένειες (A-F) (*Εικ. 1.4*) σύμφωνα με ανάλυση απαλοιφών και μεταλλάξεων της περιοχής SINE-R, ενώ η ηλικία τους υπολογίζεται στα 13.56 εκατ. χρόνια για το SVA-A και στα 3.18 εκατ. χρόνια για το SVA-F (31). Οι υποοικογένειες E, F και F1 χαρακτηρίζονται ως ανθρωπο-ειδικές και μαζί με την υποοικογένεια D είναι ιδιαίτερα πολυμορφικές στον άνθρωπο (36). Ειδικότερα, περίπου 37.5% των SVA-E και 27.6% των SVA-F (συνολικά περίπου 56 SVA) είναι επιπλέον πολυμορφικά ως προς την απουσία ή την παρουσία τους στο γένωμα. Μια έβδομη υποκατηγορία έχει αναγνωριστεί και περιλαμβάνει μια 5' μεταγωγή της αλληλουχίας του 1^{ου} εξωνίου του γονιδίου MAST2 και των συνδεδεμένων νησιδίων CpG και αναφέρεται ως CpG SVA, MAST2 SVA ή SVA-F1

(Εικ. 1.5 Γ) (35, 37, 38). Η αλληλουχία του γενετικού τόπου του MAST2 που έχει ενσωματωθεί στο SVA δρα ως θετικός ρυθμιστής της μεταγραφής του (39).

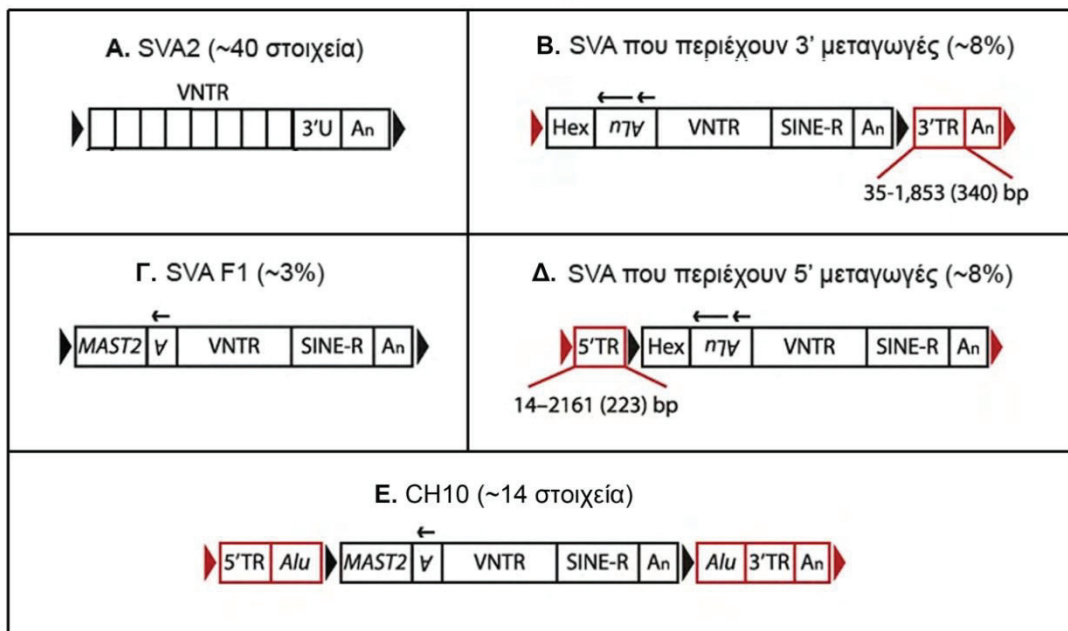


Εικόνα 1.4: Ποσοστιαία σύσταση των διάφορων υποοικογενειών SVA στο ανθρώπινο γένωμα. Αναλυτικότερα τα ποσοστά που αντιστοιχούν σε κάθε υπο-οικογένεια είναι: SVA A: 5.8%, SVA B: 15%, SVA C: 7.3%, SVA D: 42.7%, SVA E: 4.4%, SVA F: 9.5% και οι υπόλοιπες υποκατηγορίες (π.χ. SVA2, SVA10): 15.3%.

Η ανάλυση του ανθρώπινου γενώματος απέδειξε ότι η περιοχή SINE-R είναι εξαιρετικά συντηρημένη με ομοιότητα που ξεπερνά το 99% κατά την εξέταση πρόσφατων ενσωματώσεων στοιχείων SVA. Όλα τα στοιχεία SVA ήταν >89% όμοια μεταξύ τους (40) γεγονός που αποτελεί μια ένδειξη ότι εξελίχθηκαν πρόσφατα. Οι νεότερες υποοικογένειες SVA-E και F τείνουν να έχουν μεγαλύτερου μήκους VNTRs αναφορικά με τις άλλες πιο παλιές εξελικτικά υποοικογένειες B, C και D. Σημειωτέον ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του μήκους των VNTR και της ηλικίας των υποοικογενειών με εξαίρεση τα SVA-A.

Τα ρετροτρανσποζόνια που βρίσκονται για μεγάλο χρονικό διάστημα στο γένωμα, συσσωρεύουν τυχαίες μεταλλάξεις. Συνεπώς, η απόκλιση στην αλληλουχία σε μια οικογένεια ρετροτρανσποζονίων συσχετίζεται με την ηλικία τους [23]. Για το λόγο αυτό, τα στοιχεία SVA, θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους δείκτες κατά τη φυλογενετική ανάλυση πρωτευόντων ή ανθρώπων καθώς και για πληθυσμιακές μελέτες.

Τα SVA είναι εξελικτικά νέα, γεγονός που καθιστά ευκολότερη την αναγνώριση της προελεύσεως της σύνθετης δομής τους. Κατά την αλληλούχιση του γενώματος του *Rhesus macaque* (41) δεν υπήρχαν SVA, αλλά διαπιστώθηκε πως κάθε μεμονωμένη συνιστώσα (CCCTCT εξαμερές, Alu-like, VNTR, SINE-R), ήταν παρούσα ανεξάρτητα από άλλες δομές. Η περιοχή VNTR βρέθηκε σε 40 αντίγραφα, περιείχε μια άγνωστη αλληλουχία στο 3' άκρο ακολουθούμενη από μια πολύ-A ουρά και όλη η δομή οριζωνταν από διπλασιασμούς της αλληλουχίας στόχου. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν πως το VNTR ήταν ικανό για ρετρομετάθεση. Η περιοχή VNTR αποτελεί τόσο έναν πολυμορφικό βιοδείκτη που σχετίζεται με πολλές διαταραχές όσο και ρυθμιστική περιοχή της μεταγραφής *in vivo* και *in vitro*. Περιοχές VNTRs όμοιες με αυτές που έχουν περιγραφεί για τον *Rhesus macaque* και αναφέρονται ως στοιχεία SVA2 (Εικ. 1.5 A) έχουν αναφερθεί και στη βάση δεδομένων Repbase (42). Η απουσία SVA στους πιθήκους (41) δείχνει ότι αποτελούν ανθρωποειδικά ρετροτρανσποζόνια (43). Φαίνεται ότι και οι υπόλοιπες περιοχές ενσωματώθηκαν στα SVA2 μετά το διαχωρισμό των ανθρωπίδων από τους πιθήκους. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές στο γένομα των ανθρωποειδών: SVA που περιλαμβάνουν 3' μεταγωγές (Εικ. 1.5 B), 5' μεταγωγές (Εικ. 1.5 Δ) ή μεταγωγές και των δύο ειδών (Εικ. 1.5 E).



Εικόνα 1.5: Η δομή του SVA και των διάφορων παραλλαγών που έχουν εντοπιστεί στο γένομα. **A:** Το στοιχείο SVA2 αποτελείται από ένα μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR) που καταλήγει σε μια μοναδική 3' αλληλουχία και μια ουρά πολυ-A. **B, Δ:** Στο ανθρώπινο γένομα υπάρχουν SVA τα οποία φέρουν 3' ή/και 5' μεταγωγές. Τα κόκκινα τρίγωνα αντιπροσωπεύουν διπλασιασμούς της αλληλουχίας στόχου. **Γ:** Κάποιες αλληλουχίες που συµμεταφέρονται ανοδικά των SVA μπορεί να έχουν προκύψει από μάτισμα ενός εξωνίου

εντός της αλληλουχίας SVA. Ένα παράδειγμα αποτελεί το εξόνιο του γονιδίου *MAST2* που είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της ομάδας *SVA-F1*. **E:** Κάποια στοιχεία μπορεί να περιλαμβάνουν τόσο 5' όσο και 3' μεταγωγές (*CH10*).

Η Alu like περιοχή πιθανολογείται ότι έχει σχηματιστεί από εναλλακτικό μάτισμα δύο αλληλουχιών Alu και της άγνωστης αλληλουχίας SVA-U. Συνοπτικά, ένα mRNA που περιείχε το εξαμερές CCCTCT υπέστη, πιθανότατα, μάτισμα στο Alu στη θέση 279 και στο ίδιο Alu, παρακάμπτοντας την ενδιάμεση αλληλουχία στη θέση 23, ενώνοντας τα εξαμερή και τα 5' Alu κομμάτια. Στη συνέχεια το ίδιο Alu υπέστη μάτισμα σε μια αλληλουχία καθοδικά (SVA-U) ενώ ακολούθησε μάτισμα ενός δεύτερου Alu σε μια μη καθορισμένη θέση (*Εικ. 1.4*).

Το LTR της περιοχής SINE-R δεν περιλαμβάνει την ακολουθία U5 και καταλήγει στο σήμα πολυ-A του HERV-K10 κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι το SINE-R δεν ενσωματώθηκε στο SVA μέσω ενός DNA αλλά ενός RNA μηχανισμού. Ένας πιθανός μηχανισμός για την ενσωμάτωση του VNTR είναι η αλλαγή εκμαγείου κατά την αντίστροφη μεταγραφή των mRNAs των HERV-K10 και VNTR. Μια λιγότερο πιθανή εκδοχή είναι το εναλλακτικό μάτισμα στην αλληλουχία επν του HERV-K10 (44). Είναι πιθανό ότι η ρετρομετάθεση του εξαμερούς συνοδεύτηκε αρχικά από ενσωμάτωση του πρώτου τμήματος Alu κι έπειτα του SVA-U, του δεύτερου τμήματος Alu, του VNTR και του SINE-R. Τα γεγονότα αυτά θεωρούνται ότι συνέβησαν ανεξάρτητα και διαδοχικά ωστόσο η έλλειψη ενδιάμεσων SVA σε γενωμικές ακολουθίες αντιτίθεται στο μοντέλο αυτό.

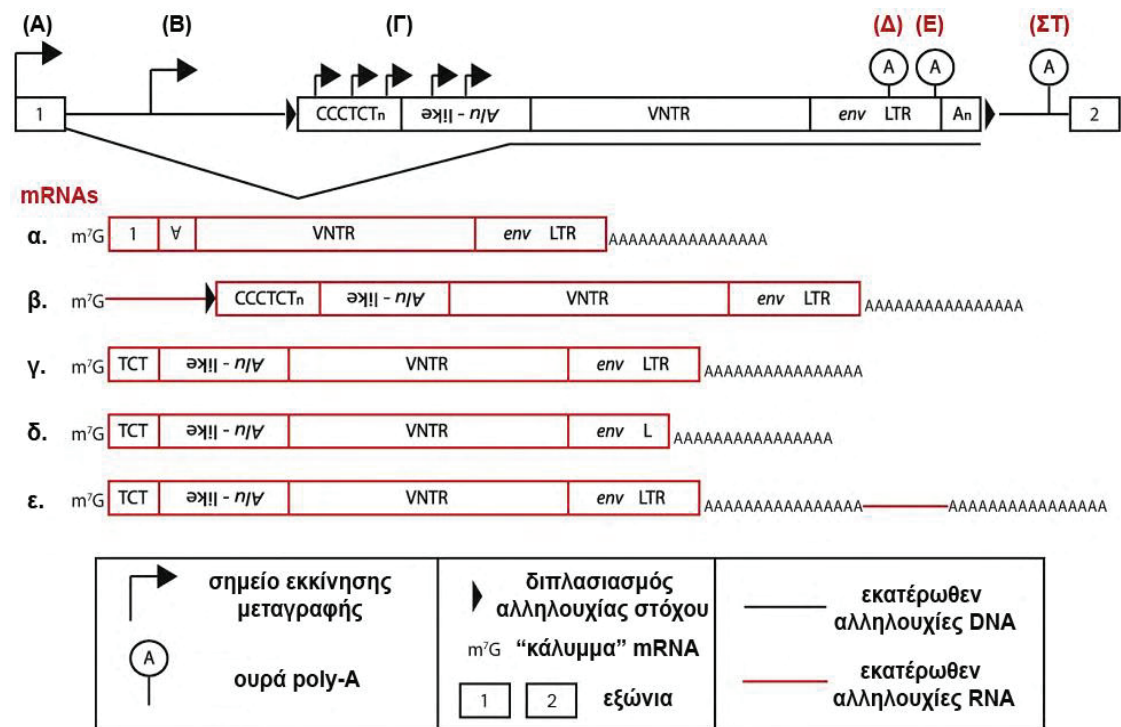
1.5 Μεταγραφή και ρετρομετάθεση των SVA

1.5.1 Ρύθμιση της μεταγραφής των SVA

Η ακριβής μεταγραφική μονάδα του SVA μαζί με τον υποκινητή και τα ρυθμιστικά στοιχεία δεν έχουν ακόμη καθοριστεί. Το SVA μεταγράφεται πιθανότατα από την RNA πολυμεράση II διότι η αλληλουχία του περιέχει πολλά σήματα τερματισμού της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση III (TTTT) κατά μήκος της Alu-like και της SINE-R περιοχής. Στο 1/3 των γενωμικών ενθέσεων των SVA υπάρχει ένα κατάλοιπο μεθυλογουανωσίνης (5' κάλυμμα) στο 5' άκρο τους, όπως προκύπτει βάσει ενίσχυσης των SVA RNA με τη μέθοδο 5' RACE (37). Επιπλέον,

υπάρχει μια υποκατηγορία SVA που φέρει ένα εναλλακτικό εξαμερές (CCCTCT)₂ CCCG \underline{C} TCT)_n όπου το G μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα παράδειγμα όπου το 5' κάλυμμα μεταγράφηκε αντίστροφα και αυτή η προσθήκη νουκλεοτιδίου να διατηρήθηκε μαζί με το εξαμερές.

Τα RNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή των SVA ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής (37): **α.** αλληλουχίες SVA εντός των οποίων έχει συμβεί μάτισμα εξωνίων που βρίσκονται ανοδικά (exon trapping) (Εικ. 1.6), **β.** εκείνα στα οποία η μεταγραφή ξεκινά από έναν υποκινητή που εντοπίζεται ανοδικά της αλληλουχίας του SVA (Εικ. 1.6 β) και **γ.** αυτά στα οποία η μεταγραφή ξεκινά στο εσωτερικό της αλληλουχίας τους (Εικ. 1.6 γ,δ,ε). Δεν έχει διασαφηνιστεί ποιος τύπος μεταγραφής είναι το προτιμώμενο μοντέλο έκφρασης ωστόσο είναι γνωστό ότι τα SVA εκφράζονται σε κυτταρικές σειρές και in vivo (35, 37, 45). Εκείνα τα οποία φέρουν 5' μεταγωγές είτε λόγω εναλλακτικού ματίσματος είτε λόγω ανοδικής έναρξης της μεταγραφής είναι μεταγραφικά ενεργά και αποτελούν το 8% των συνολικών ενθέσεων SVA στο γένωμα (35). Η ποικιλομορφία στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής μπορεί να οφείλεται στο ότι το SINE-R μπορεί να κάνει θηλιά και να τοποθετηθεί μπροστά από το VNTR στο 5' άκρο του SVA (7).



Εικόνα 1.6: Μεταγραφή SVA και δομή των πιθανών mRNA. Στην εικόνα παρουσιάζεται ένα πλήρους μήκους SVA που εδράζεται εντός του ιντρονίου ενός γονιδίου και εκατέρωθέν του τα

εξώνια 1 και 2. Τα μαύρα βέλη (A-G) δείχνουν τα πιθανά σημεία εκκίνησης της μεταγραφής ενώ παρουσιάζονται τα μετάγραφα που προκύπτουν (α-ε) ανάλογα με το σημείο έναρξης της μεταγραφής και το σήμα πολυ-A (Δ-ΣΤ). **α:** Η μεταγραφή μπορεί να ξεκινήσει από ανοδικά εξώνια (A) και να συμβεί μάτισμα εντός της αλληλουχίας του SVA τερματίζοντας σε ένα κανονικό σήμα πολυ-A (E). **β:** Η μεταγραφή μπορεί επίσης να ξεκινήσει από ένα σημείο ανοδικά του SVA (B) δημιουργώντας mRNAs που περιέχουν 5' μεταγωγές. **γ, δ, ε:** Η μεταγραφή μπορεί να ξεκινήσει εντός της περιοχής των εξαμερών ή της Alu-ομόλογης περιοχής και να τερματιστεί σε ένα μη κανονικό σήμα πολυ-A εκτός του SINE-R (Δ), στο πολυ-A του SVA (E) ή και σε κάποιο καθοδικό πολυ-A (ΣΤ).

Τα RNA που προκύπτουν από τα SVA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα και με το πολυ-A τους. Η αλληλουχία του SVA περιέχει ένα κανονικό σήμα πολυαδενυλίωσης AATAAA στο 3' άκρο της (Εικ. 1.6 γ). Παρόλα ταύτα, η μεταγραφή του μπορεί να μη σταματήσει εκεί αλλά σε κάποιο άλλο σήμα πολυαδενυλίωσης (34, 46). Σε κάποια SVA μπορεί να τερματίζεται σε μη κανονικά πολυ-A σημεία εντός του SINE-R οδηγώντας σε 3' κολοβωμένες ενθέσεις (31, 35) (Εικ. 1.6 δ) ή καθοδικά του 3' άκρου τους συμπαρασύροντας τη μεταγραφή ενδιάμεσων 3' αλληλουχιών (Εικ. 1.6 ε). Το μέγεθος μιας γενωμικής ακολουθίας που μπορεί να μεταφερθεί με τον τελευταίο τρόπο μπορεί να κυμαίνεται από μερικές βάσεις μέχρι και πάνω από 1500 ζεύγη βάσεων. Ίσως το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι η μεταγωγή ολόκληρου του γονιδίου AMAC στο γονιδίωμα των πιθήκων (46).

Συνολικά, υπάρχουν τρία πιθανά σενάρια σχετικά με τη μεταγραφή των SVA: α. όπως τα L1 και τα Alu, βασίζονται αποκλειστικά σε δικό τους υποκινητή και ρυθμιστικά στοιχεία, β. δεν περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία και εξαρτώνται αποκλειστικά από εξωτερικά ρυθμιστικά στοιχεία και γ. περιέχουν κάποια ρυθμιστικά στοιχεία που μπορεί να δρουν συνεργιστικά με εξωτερικά, που οδηγούν τη μεταγραφή του SVA. Πειράματα για τον εντοπισμό δραστηριότητας υποκινητή έχουν οδηγήσει σε αμφιλεγόμενα συμπεράσματα (Kazazian και Seleme, μη δημοσιευμένα δεδομένα). Με βάση ένα σύστημα που στηρίζεται στην έκφραση λουσιφεράσης, δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν δραστηριότητα υποκινητή στα 700 bp της αλληλουχίας ανοδικά του SVA που είχε εντεθεί στο γονίδιο της α-σπεκτρίνης (47) (SVA-SPTA1) ή εντός των εξαμερών ή τμήματος της Alu-like περιοχής. Μελέτη αναφορικά με τη φύση της ρετρομετάθεσης SVA απέδειξε ότι καμία ανεξάρτητη περιοχή δεν είναι θεμελιώδης για να συμβεί, αλλά κάθε περιοχή επηρεάζει διαφορετικά το ρυθμό με τον οποίο η ρετρομετάθεση μπορεί να λάβει χώρα (48).

Αναφορικά με το τρίτο πιθανό μοντέλο μεταγραφής, έχει αναφερθεί ότι τα SVA μπορεί να διαθέτουν ένα εσωτερικό στοιχείο-ενισχυτή με δυνατότητα να στρατολογεί μεταγραφικούς παράγοντες σε έναν υποκινητή ανοδικά του στοιχείου, οδηγώντας σε μεταγραφή του. Τα SVA περιέχουν πολλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (34). Για παράδειγμα, το SINE-R περιέχει ένα στοιχείο απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή και στον NF-κB (Πίνακας 1.1). Αυτές οι θέσεις μπορεί να δρουν συνεργιστικά για την έναρξη της μεταγραφής όπως έχει βρεθεί και για τα Alu (40, 49). Η απουσία εσωτερικού υποκινητή και η παρουσία στοιχείων ενισχυτών στο SINE-R μπορεί να ευθύνεται για την ποικιλομορφία δομής των SVA και συμβαδίζει με την παρατήρηση ότι ρετρομεταθετικά ενεργά στοιχεία μπορεί να μην έχουν εξαμερή ή και την Alu-like περιοχή (35, 37).

Μεταγραφικοί παράγοντες	Περιοχή πρόσδεσης στην αλληλουχία SINE-R
Krueppel like	34-50, 118-134
PAX-2/5/8	35-49
SWI-SNF related	43-53
Glucocorticoid responsive and related elements	59-77
SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	64-86, 191-213
Hepatic nuclear factor	70-86, 75-91, 100-116, 107-123
Autoimmune regulatory element binding factor	126-152
NFκB/c-rel	161-173
Nuclear factor of activated T-cells	184-202
LEF1/TCF	196-212
NGFI-B	193-207
Heat shock factors	272-296
Myc associated zing fingers	226-238

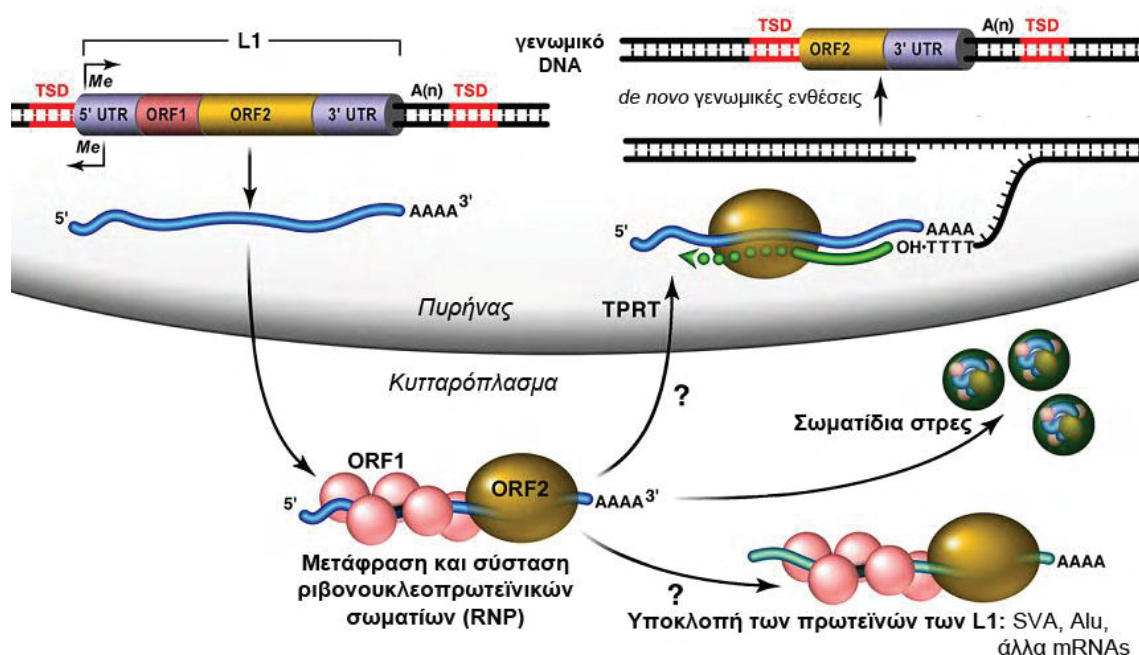
Πίνακας 1.1: Προβλεπόμενες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην αλληλουχία του SVA. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του αλγορίθμου MatInspector (www.genomatix.de).

1.5.2 Το μοντέλο ρετρομετάθεσης των SVA

Για να συμβεί ένα γεγονός ρετρομετάθεσης πέραν της μεταγραφής του τρανσποζονίου, θα πρέπει να συμβεί και αντίστροφη μεταγραφή του ώστε να εντεθεί σε μια νέα θέση στο γένωμα. Έχει υποτεθεί ότι το SVA βασίζεται στην αντίστροφη

μεταγραφάση των L1 για την κινητοποίησή του και πρόσφατες αναφορές αποδεικνύουν την κινητοποίηση αυτή σε καρκινικά κύτταρα HeLa (34, 50, 51). Η υπόθεση στηρίχτηκε στο ότι οι γενωμικές ενθέσεις των SVA παρουσιάζουν όλα τα κλασσικά σημεία της L1-μεσολαβούμενης ρετρομετάθεσης και του μηχανισμού που αναφέρεται ως αντίστροφη μεταγραφή πριμοδοτούμενη από την αλληλουχία στόχο (TPRT: Target Primed Reversed Transcription) (Εικ. 1.7). Χαρακτηριστικά του μηχανισμού αποτελούν:

1. Η ένθεση στο συντηρημένο μοτίβο 5'- TTTT/AA -3' (η παύλα συμβολίζει το σημείο τομής) που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση των L1 (26).
2. Οι ευθείες επαναλήψεις αλληλουχίας στόχου (TSD) μήκους 4-20 bp εκατέρωθεν κάθε ένθεσης.
3. Μια ουρά πολύ-A ποικίλου μήκους
4. Η αποκοπή τμημάτων στο 5' άκρο
5. Οι εσωτερικές αναδιατάξεις και αναστροφές (52, 53)
6. Οι 3' μεταγωγές (46, 54, 55)



Εικόνα 1.7: Ο κύκλος ρετρομετάθεσης των L1 και η υποκλοπή των πρωτεϊνών ORF1 και ORF2 από άλλα mRNAs. Όταν μεταγράφεται, το mRNA των L1 (μπλε γραμμή) εξέρχεται από τον πυρήνα και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου ενώνεται με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιεί και συνιστά τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (RNPs). Τα RNPs εισέρχονται στον πυρήνα κατά τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου στη διάρκεια της μίτωσης. Το RNA του L1 μεταγράφεται αντίστροφα και ενσωματώνεται και πάλι στο γένωμα με το μηχανισμό TPRT. Πολύ συχνά, η αντίστροφη μεταγραφάση αποτυγχάνει να προχωρήσει προς το 5' άκρο οδηγώντας σε de novo κολοβωμένες ενθέσεις οι οποίες δε μπορούν να ρετρομετατεθούν

περαιτέρω. Τα mRNA των L1 και οι πρωτεΐνες, διαχωρίζονται σε σωματίδια στρες, δηλαδή σε κυτταροπλασματικά αθροίσματα που επάγονται από πολλές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης υποξίας, θερμικού σοκ και οξειδωτικού στρες (56). Οι πρωτεΐνες ORF1 και ORF2 μπορεί να «υποκλαπούν» από Alu- ή SVA- RNAs καθώς και από κυτταρικά mRNA κάνοντας, έτσι, εφικτή τη ρετρομετάθεσή τους και συμβάλλοντας στη γενετική ποικιλότητα. Τροποποιημένη από (57).

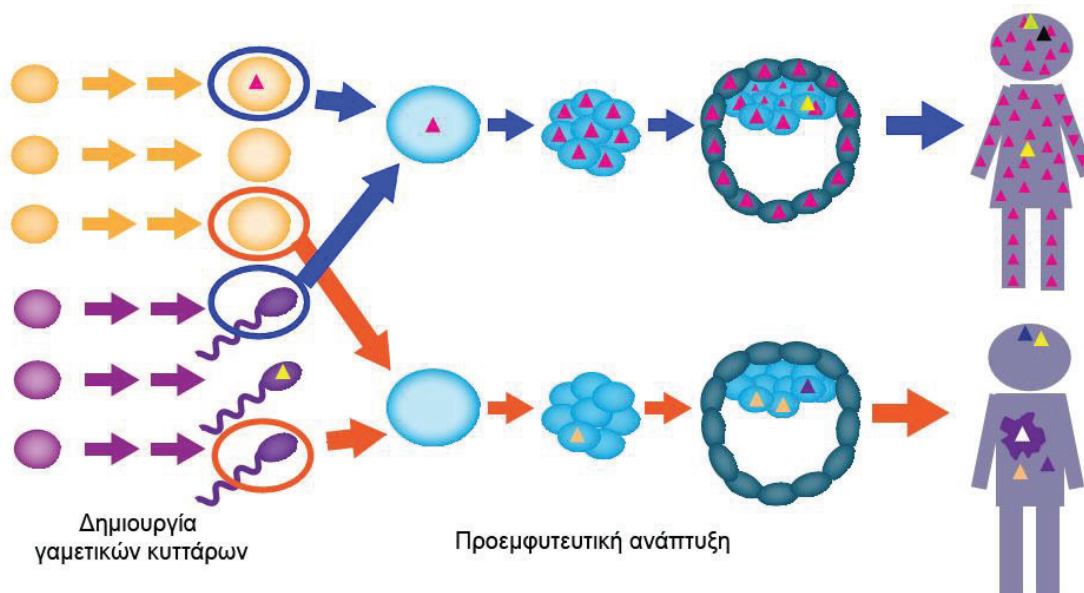
Είναι γνωστό ότι τα Alu υποκλέπτουν επιτυχώς το μηχανισμό των LINEs για τη ρετρομετάθεσή τους. Μετά τη μεταγραφή, το RNA του SVA πρέπει: **α.** να έρθει σε επαφή με την πρωτεΐνη ORF2 L1 και **β.** να συναγωνιστεί το RNA του L1 για αντίστροφη μεταγραφή. Αυτό συμβαίνει στο ριβόσωμα για τα RNA των L1 και Alu (58, 59) ή εκεί που το Alu ενσωματώνεται στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίο (RNP) των L1 (Εικ. 1.7). Έχει υποτεθεί ότι η Alu-like περιοχή των SVA, υβριδοποιείται με τα Alu RNA που λειτουργούν ως «συνοδοί» των SVA-RNA στα ριβοσώματα (13). Ωστόσο η διαδικασία για το SVA στο σύνολό της είναι άγνωστη και μπορεί να συμβαίνει είτε στο ριβόσωμα είτε στον πυρηνίσκο (60) όπου έχουν εντοπιστεί χμιαρικά L1-U6 ρετρογονίδια. Μετά την ενσωμάτωση στο L1 RNP τα SVA μεταγράφονται αντίστροφα στον πυρήνα από την ORF2 (61).

1.6 Ο αντίκτυπος των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αλληλεπιδρούν άμεσα με τις αλληλουχίες του ξενιστή και προσδίδουν πλαστικότητα και σταθερότητα στο γένωμα. Κάποιες αλληλουχίες που προκύπτουν από μεταθετά στοιχεία, αποτελούν τα πιο συντηρημένα στοιχεία του ανθρώπινου γενώματος διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη δομή και λειτουργία του (62). Η ανίχνευση χιλιάδων πολυμορφικών ενθέσεων σε δείγματα ανθρώπινου DNA συνάδει με την παρατήρηση πως ρετρομεταθετικά γεγονότα συμβαίνουν διαρκώς στο ανθρώπινο γένωμα (63-66). Ενθετικοί πολυμορφισμοί που δεν υπάρχουν στα δημοσιευμένα ανθρώπινα γενώματα αναφοράς και που ανιχνεύονται σε πολλά άτομα ή πολλούς ιστούς του ίδιου ατόμου, θεωρείται πως έχουν συμβεί σε γαμετικά κύτταρα ενώ οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύονται σε έναν ιστό θεωρούνται σωματικές ενθέσεις (Εικ. 1.8). Οι πολυμορφικές ενθέσεις αφορούσαν κυρίως στοιχεία Alu (~60-80%) (67) κι έπειτα κατά σειρά τα L1, τα SVA και σπανιότερα (<1%) τα στοιχεία LTR. Οι ενθέσεις ρετρομεταθετών στοιχείων ανά

γέννηση έχουν υπολογιστεί σε 1 στις 100, 1 στις 20 και μια στις 900 για τα L1, τα Alu και τα SVA αντίστοιχα (68) και είναι υπεύθυνες για το 0.1% των αυθόρμητων μεταλλάξεων στον άνθρωπο (69).

Οι ενθέσεις τους στο χρωμοσωμικό DNA συμβαίνουν τυχαία με αποτέλεσμα, γεγονότα μετάθεσης να συμβαίνουν πολλές φορές σε περιοχές με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της αλληλουχίας κωδικευουσών και ρυθμιστικών περιοχών οδηγώντας στην πρόκληση ασθενειών. Τα μεταθετά στοιχεία περιλαμβάνουν cis-ρυθμιστικά στοιχεία και είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται, οδηγώντας σε γενωμική διασπορά τέτοιων ρυθμιστικών στοιχείων. Τα αντίγραφα τους περιέχουν 4 τύπους ρυθμιστικών αλληλουχιών που είναι απαραίτητες για την έκφρασή τους: υποκινητές, θέσεις ματίσματος, θέσεις τερματισμού και ενισχυτές/επαυξητές. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου ρετροτρανσποζόνια μέσω εισαγωγικής μεταλλαξιγένεσης οδηγούν σε καρκινογένεση. Επίσης, η γενική υπομεθυλίωση του γενώματος έχει αναφερθεί ακόμη και στα αρχικά στάδια της καρκινικής εξαλλαγής (70). Η αύξηση της έκφρασης των ρετροτρανσποζονίων σε συνδυασμό με την αύξηση της συχνότητας των μεταλλάξεων σε ανθρώπινους καρκίνους, αποδεικνύει ότι η έκφραση και συνακόλουθα η δραστηριότητα των ρετροτρανσποζονίων μπορεί να είναι από τους παράγοντες που προκαλούν γενετική αστάθεια, επιταχύνοντας την εξέλιξη του όγκου.

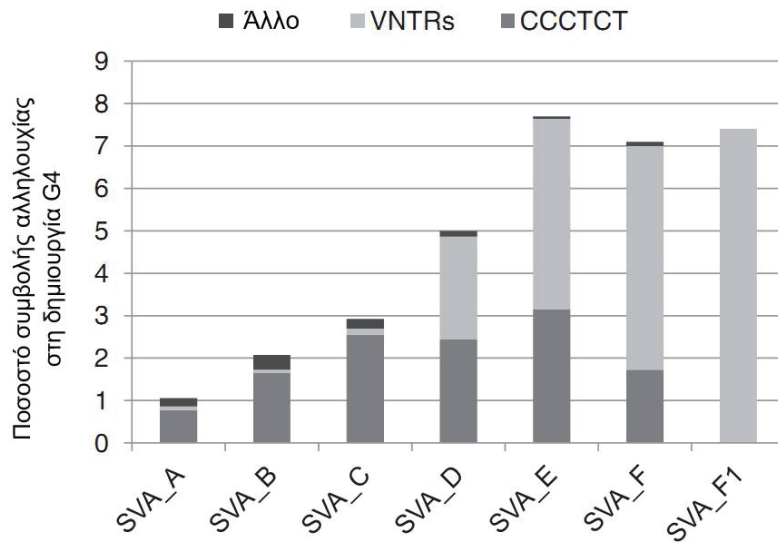


Εικόνα 1.8: Αναπτυξιακά στάδια και ιστοί στους οποίους συμβαίνει συχνά ρετρομετάθεση. Τα τρίγωνα υποδεικνύουν ενθέσεις ρετρομεταθετών στοιχείων και τα διαφορετικά χρώματα, ανεξάρτητες ενθέσεις. Οι ενσωματώσεις που συμβαίνουν κατά τη δημιουργία των ωαρίων (πορτοκαλί κύτταρα) και σπερματοζωαρίων (μωβ κύτταρα) μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ατόμων που τις φέρουν σε όλα τα κύτταρά τους. Οι σωματικές ενθέσεις μπορεί να

συμβούν σε μερικά κύτταρα στα αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης (μπλε κύτταρα), στον εγκέφαλο και σε καρκινικά κύτταρα (μωβ ιστός) οδηγώντας σε φαινόμενα μωσαϊκισμού.

Τα μεταθετά στοιχεία, θεωρούνται πολύ σημαντικά για τη «σύνδεση» γονιδίων ώστε να αποτελούν ένα μεταγραφικό δίκτυο. Ένα σημαντικό παράδειγμα συναντάται στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα είναι πολυδύναμα αλλά μπορούν να εισέλθουν σε ολοδύναμη φάση απ' όπου μπορούν να προκύψουν εμβρυονικές και εξω-εμβρυονικές γενεαλογίες κυττάρων (71). Η μετατροπή αυτή στηρίζεται στην ενεργοποίηση ενός δικτύου μεταγραφημάτων που ξεκινούν από τα ERV LTRs και ελέγχονται από επιγενετικές τροποποιήσεις. Στην πολυδύναμη κατάσταση, οι ERVs αποσιωπούνται μέσω μεθυλίωσης της θέσης H3K9 (72).

Ειδικότερα, όσο αφορά τα SVA, η φύση της αλληλουχίας που περιέχεται εντός των SVA παρέχει δυναμικό για δημιουργία δευτεροταγών δομών όπως τετραμερή γουανίνης (G4) (73). Οι δομές αυτές προβλέπονται από βιοπληροφορική ανάλυση και θεωρείται ότι παρεμβαίνουν στην αντιγραφή του DNA και εμπλέκονται σε ρύθμιση λειτουργιών όπως στη γονιδιακή έκφραση, τη γενωμική σταθερότητα και τη δράση της τελομεράσης κατά την αντιγραφή των άκρων των χρωμοσωμάτων (Εικ. 1.9) (74).



Εικόνα 1.9: Η πλήρης αλληλουχία SVA περιλαμβάνει περιοχές με δυνατότητα να σχηματίζουν σταθερές δομές τετραμερών γουανίνης – G4. Η εικόνα παρουσιάζει το ποσοστό με το οποίο κάθε συνιστώσα του SVA μπορεί να σχηματίσει τετραμερή γουανίνης (έγινε χρήση του λογισμικού *Quadparser*, τροποποιημένη από (32)).

Υπάρχουν 65 γνωστές ασθένειες που οφείλονται σε Alu, L1 και SVA μεταξύ των οποίων και πολλές περιπτώσεις καρκίνου (7). Παραδείγματα ασθενειών που

οφείλονται σε ενθέσεις στοιχείων Alu είναι η νευροϊνωμάτωση τύπου 1 έπειτα από ένθεση στο γονίδιο NF1, ο καρκίνος μαστού έπειτα από ένθεση στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 καθώς και το ρετινοβλάστωμα που προκύπτει από ένθεση στο γονίδιο CRB1 (75, 76). Επιπλέον, ένθεση ενός L1 στα γονίδια APC, MYC, PDH και στον παράγοντα δ , έχει οδηγήσει σε καρκίνο παχέως εντέρου (77), καρκίνο μαστού (78), ανεπάρκεια πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και αιμορροφιλία A αντίστοιχα (16, 78). Ενθέσεις μπορούν να συμβούν τόσο σε περιοχές που δεν αντιστοιχούν σε γονίδια, όσο και εντός αυτών. Ο αντίκτυπος των τελευταίων, συνοψίζεται στον Πίνακα 1.2 και αναλύεται στις παρακάτω ενότητες 1.6.1 – 1.6.8.

Περιοχή Ένθεσης	Αντίκτυπος
5' αμετάφραστη περιοχή, υποκινητής	<ul style="list-style-type: none"> • Εισαγωγή θέσεων μεθυλίωσης (Εικ. 1.10 η) • Εναλλακτικοί υποκινητές (79, 80) • Εισαγωγή πιθανόν ρυθμιστικών αλληλουχιών (81) (Εικ. 1.10 γ) • Αλλαγή έκφρασης γειτονικών γονιδίων (82, 83)
Ιντρόνια	<ul style="list-style-type: none"> • Εναλλακτικό μάτισμα / Εξωνισμός (84) • Εισαγωγή σημάτων πολυαδενυλίωσης και θέσεων ματίσματος (85-87) • RNA επεξεργασία (88) • Εισαγωγή υποκινητών και έκφραση miRNAs (89-91)
3' αμετάφραστη περιοχή	Ρύθμιση εξόδου mRNAs από τον πυρήνα (90-92)
Εξώνια	Διακοπή κωδικοποιούσας αλληλουχίας (22)

Πίνακας 1.2: Ο πιθανός αντίκτυπος των ενθέσεων ρετρομεταθετών στοιχείων στο ανθρώπινο γένομα. Παρατίθενται οι πιθανές επιπτώσεις ανάλογα με το σημείο ένθεσης.

1.6.1 Ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης

Η ανάλυση του γονιδιώματος αποκάλυψε πως πολλοί υποκινητές και εναλλακτικοί υποκινητές (περίπου το 25% των ανθρώπινων υποκινητών) περιέχουν ρετρομεταθετά στοιχεία πλησίον της αλληλουχίας τους (93-95). Το 18.1% και το

31.4% των συνολικών θέσεων έναρξης της μεταγραφής στο ποντίκι και τον άνθρωπο αντίστοιχα, προκύπτουν από μεταθετά στοιχεία και συχνά είναι ιστοειδικές (94). Στην πλειοψηφία των παραδειγμάτων που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, τα μεταθετά στοιχεία δρουν ως εναλλακτικοί υποκινητές ωστόσο μπορεί να αποτελούν και τους μοναδικούς γνωστούς υποκινητές για κάποια ανθρώπινα γονίδια (*Εικ. 1.10 α, β*). Για παράδειγμα, οι αλληλουχίες L1 και Alu, λειτουργούν ως υποκινητές για το γονίδιο HYAL-4 που είναι απαραίτητο για τον καταβολισμό του υαλουρονικού (95). Η εφαρμογή τεχνικών υψηλής ευαισθησίας όπως η μέθοδος CAGE και η αλληλούχιση PET αποκάλυψε πρόσφατα 51.197 υποκινητές που έχουν προκύψει από ενδογενείς ρετροϊούς. Σε 1.743 περιπτώσεις, οι ενδογενείς ρετροϊοί εντοπίζονταν πλησίον του γονιδίου ή στην 5' αμετάφραστη περιοχή του. Έχουν βρεθεί 114 θέσεις έναρξης της μεταγραφής που προκύπτουν από ρετροϊούς και εκκινούν τη μεταγραφή 97 ανθρώπινων γονιδίων παράγοντας χμιαρικά μετάγραφα που ξεκινούν εντός των LTR και συνεχίζουν σε γνωστές γονιδιακές αλληλουχίες (93). Επιπλέον, η παρουσία μεταθετών στοιχείων στην κωδικοποιούσα περιοχή, μπορεί να επηρεάσει την έναρξη της μεταγραφής ή τη δράση ενός ανοδικού ενισχυτή (*Εικ. 1.10 στ, ζ*)

Πολλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων προκύπτουν από απλές επαναλήψεις αλληλουχιών και μεταθετά στοιχεία. Ένας μεταγραφικός παράγοντας που θα στρατολογηθεί από ρετροτρανσποζόνια μπορεί να αυξορρυθμίσει ή να μειορρυθμίσει την έκφραση ενός γειτονικού γονιδίου. Τέλος, υπάρχουν πολλά παραδείγματα δράσης των μεταθετών στοιχείων ως ενισχυτές σε ανθρώπινους ιστούς *in vivo*. Για παράδειγμα, ένα LTR που προκύπτει από ενδογενή ρετροϊό και εδράζεται ανοδικά της ρυθμιστικής περιοχής της β-σφαιρίνης, είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της έκφρασης σε πρόδρομα ερυθροκύτταρα (92). Ο ενισχυτής του γονιδίου *apolipoprotein A* εδράζεται μέσα σε ένα στοιχείο LINE (96). Ένα στοιχείο Alu είναι μέρος ενός ενισχυτή που εδράζεται στο τελευταίο ιντρόνιο του γονιδίου CD8a στον άνθρωπο (97).

1.6.2 Αντι-νοηματικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές

Τα περισσότερα μεταθετά στοιχεία που εντοπίζονται σε ιντρόνια βρίσκονται σε αντίθετη μεταγραφική φορά με αυτή του γονιδίου (44, 98). Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι υποκινητές τους μπορεί να κατευθύνουν τη μεταγραφή μορίων RNA που είναι συμπληρωματικά σε ιντρόνια ή/και εξώνια των γονιδίων αυτών (*Εικ. 1.10 γ*).

Επιπλέον, κάποια ρετροτρανσποζόνια έχουν υποκινητές που μπορούν να λειτουργήσουν προς δυο κατευθύνσεις. Ένθεση τέτοιων στοιχείων καθοδικά κάποιων γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή αντινοσηματικών RNAs (80, 99-103). Έχουν αναγνωριστεί 48.718 τέτοιες θέσεις μέσα σε μεταθετά στοιχεία (104).

Ένας πιθανός μηχανισμός της αντινοσηματικής ρύθμισης στο επίπεδο του πρόδρομου mRNA, σχετίζεται με τη δημιουργία mRNAs που έχουν υποστεί εναλλακτικό μάτισμα. Τα αντινοσηματικά RNAs μπορούν να εμποδίσουν το μάτισμα του πρόδρομου mRNA τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (105). Ο πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει τη σύζευξη ενός αντινοσηματικού μεταγράφου με ένα νοηματικό RNA-στόχο και τη δημιουργία ενός δίκλωνου RNA που θα είχε πιθανώς ως αποτέλεσμα το ματισματόσωμα να προσπεράσει την αλληλουχία αυτή δημιουργώντας έτσι ένα εναλλακτικά ματισμένο μετάγραφο. Κατά αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσαν να δημιουργηθούν μη λειτουργικά RNA με πολλαπλά κωδικόνια πρόωρου τερματισμού που κανονικά αποδομούνται στο κυτταρόπλασμα ή απευθείας στον πυρήνα.

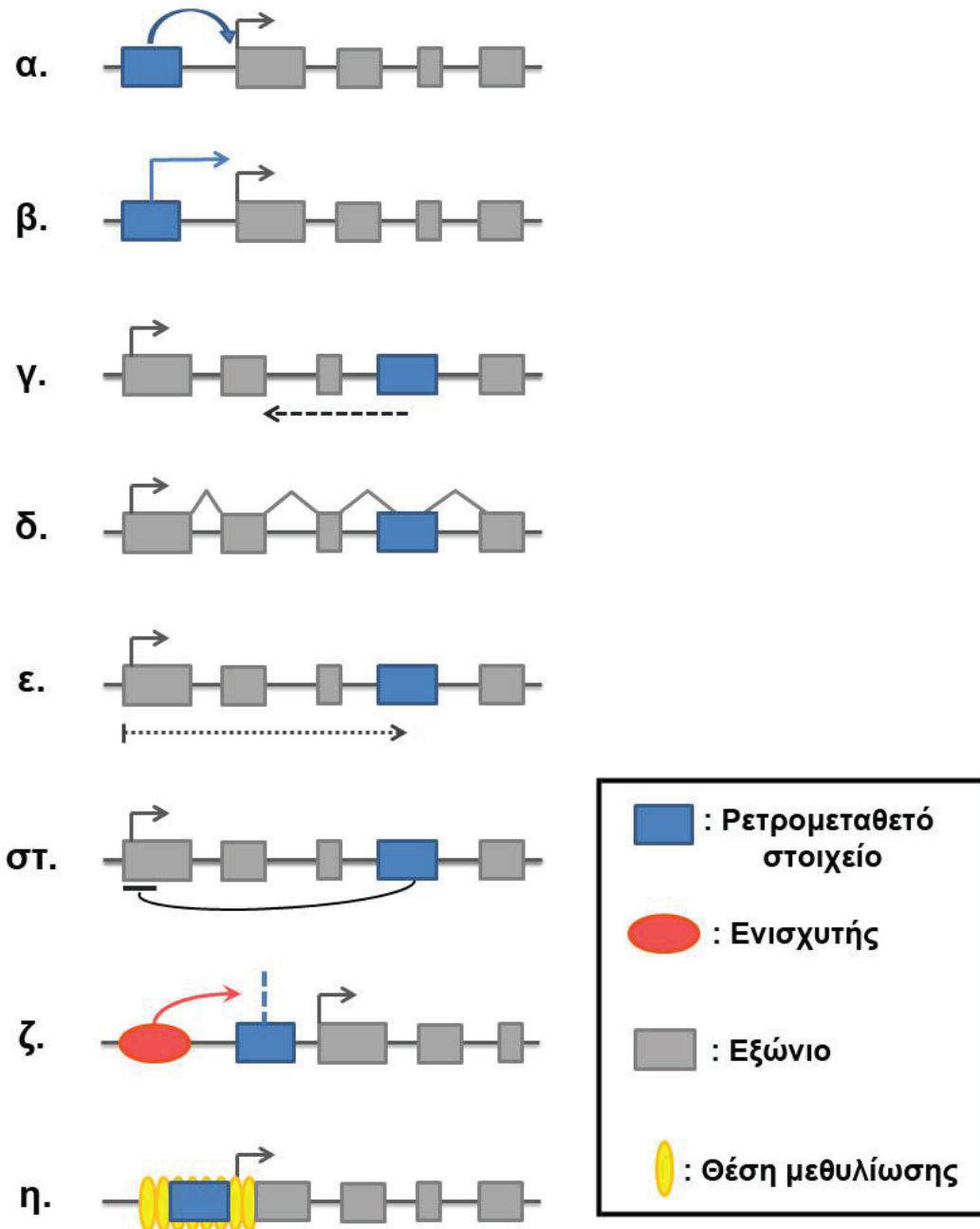
Τέλος, ορισμένα μη κωδικοποιά RNAs που παράγονται από τα μεταθετά στοιχεία συζευγνύονται με κυτταρικά mRNAs με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το RNA-επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης (RISC–RNA-induced Silencing Complex). Έτσι, προάγεται ένα σύνολο μηχανισμών που συμπεριλαμβάνουν αποδόμηση του mRNA οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση ή αποσιώπηση του γονιδίου (106).

1.6.3 Σημεία εναλλακτικού ματίσματος

Εκτός από τη ρύθμιση της μεταγραφής, τα μεταθετά στοιχεία μπορούν επίσης να εμπλακούν στο μάτισμα του πρόδρομου mRNA, καθώς είναι γνωστό ότι φέρουν θέσεις δότη και δέκτη ματίσματος εντός της αλληλουχίας τους (*Εικ. 1.10 δ*). Το 60% των τρανσποζονίων στον άνθρωπο απαντάται σε αλληλουχίες ιντρονίων (107). Η παρουσία των μεταθετών στοιχείων σε ιντρόνια μπορεί να οδηγήσει:

α. σε εναλλακτικό μάτισμα εντός της αλληλουχίας τους και στην ενσωμάτωση τμήματός τους στο mRNA, φαινόμενο που καλείται εξωνισμός (*exonization*). Όλες οι οικογένειες μεταθετών στοιχείων μπορούν να εξωνιστούν, δηλαδή μέρος της αλληλουχίας τους να συμπεριληφθεί στο mRNA. Τα Alu εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό εξωνισμού. Τουλάχιστον 6 γονίδια που περιέχουν Alu στα εξώνιά τους ματίζονται συνεχώς εντός αυτών (FAM55C, NLRP1, ZNF611, ADAL, RPP38 και RSPH10B) (84, 108, 109).

β. σε δημιουργία εναλλακτικών υποκινητών (Πίνακας 1.2) που ανάλογα με τη φορά ένθεσης μπορούν να δράσουν είτε ανοδικά ή καθοδικά (Εικ. 1.10 δ). Οι ιντρονικές ενθέσεις έχουν επίσης συσχετιστεί με αποσταθεροποίηση του mRNA οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση.



Εικόνα 1.10: Αποτέλεσμα ρετρομετάθεσης στη γονιδιακή έκφραση. **α.** Ρετρομεταθετά στοιχεία μπορεί να λειτουργούν ως ενισχυτές της μεταγραφής γονιδίων. **β, γ:** Ένα ρετροτρανσποζόνιο φέρει νοηματικούς και αντινοηματικούς υποκινητές από τους οποίους μπορεί να ξεκινήσει η μεταγραφή καθοδικά ή ανοδικά. **δ.** Παρέχουν θέσεις δότη και δέκτη ματίσματος με αποτέλεσμα μέρος της αλληλουχίας τους να αποτελεί κομμάτι των εξωνίων. **ε.** Οδηγούν σε πρόωρη διακοπή της μεταγραφής. Η παρουσία ενός ρετροτρανσποζονίου σε

ιντρόνιο ενός γονιδίου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρη λήξη της μεταγραφής στο πολυ-Α του στοιχείου. **στ.** Αναστέλλουν την έναρξη της μεταγραφής. **ζ.** Μπορούν να παρέμβουν στη δράση ενός στοιχείου – ενισχυτή στην έκφραση γονιδίων. **η.** Μια ρετροτρανσποζονιακή αλληλουχία μπορεί να μεθυλιωθεί οδηγώντας σε δημιουργία ετεροχρωματινής, αλλάζοντας την έκφραση παρακείμενων γονιδίων.

Γενικότερα, υπάρχει μια αρνητική εξελικτική πίεση για τα μεταθετά στοιχεία που εντοπίζονται εντός ιντρονίων και στην ίδια μεταγραφική φορά με το γονίδιο (110). Σε όλα τα εξετασθέντα γενώματα, τα μεταθετά στοιχεία στην ίδια μεταγραφική φορά με το γονίδιο υποεκπροσωπούνται συγκριτικά με την αναμενόμενη αναλογία νοηματικών/αντινοηματικών ενθέσεων (44).

1.6.4 Παροχές σημάτων πολυαδενυλίωσης

Η πολυαδενυλίωση του mRNA είναι ένα σημαντικό βήμα για την ωρίμανση όλων των ευκαρυωτικών mRNA και συνδέεται στενά με τον τερματισμό της μεταγραφής. Ένα σήμα πολυαδενυλίωσης (AAUAAA) κοντά στο 3' άκρο του πρόδρομου mRNA απαιτείται για τη σύνθεση της ουράς πολυΑ (Εικ. 1.10 ε). Τα αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια κωδικοποιούν πρωτεΐνες και χρησιμοποιούν λειτουργικά πολυΑ σήματα στο 3' άκρο των αλληλουχιών τους. Για το λόγο αυτό, η ένθεση των στοιχείων αυτών εντός γονιδίων σε νοηματική φορά μπορεί να επηρεάσει την έκφραση γειτονικών γονιδίων παρέχοντας νέα σήματα πολυ-Α. Υπολογίστηκε ότι ~8% των πολυΑ σημάτων των θηλαστικών σχετίζεται με μεταθετά στοιχεία (111).

1.6.5 Σπασίματα διπλής έλικας DNA

Η αλληλουχία ORF2 στα ρετροτρανσποζόνια L1 κωδικοποιεί την παραγωγή ενός ενζύμου που έχει και δραστικότητα ενδονουκλεάσης και μπορεί να δημιουργήσει σπασίματα στη διπλή έλικα του DNA. Η αυξημένη έκφρασή της σε καταστάσεις υπομεθυλίωσης του γενώματος, μπορεί να συμβάλλει στη γενωμική αστάθεια που παρατηρείται στον καρκίνο (112). Αυτό υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι σε κύτταρα HeLa, τα L1-επαγόμενα σπασίματα DNA είναι 10-100 φορές περισσότερα σε αριθμό από τα γεγονότα ρετρομετάθεσης των L1. Στον καρκίνο του προστάτη υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης του L1 ORF2 με τη δημιουργία χρωμοσωμικών μετατοπίσεων που οδηγούν σε μετάγραφα που

κωδικοποιούν πρωτεΐνες σύντηξης (55). Η απουσία των σημείων ελέγχου στα καρκινικά κύτταρα που αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με βλάβες στο DNA, μπορεί να επιτρέψει την παρουσία τέτοιων σχάσεων (113).

1.6.6 Τα μεταθετά στοιχεία ως παράγοντες ανασυνδυασμού

Ο ανασυνδυασμός είναι ένας ισχυρός παράγοντας που συμβάλλει στην εξέλιξη και προάγει γενετική ποικιλομορφία μέσω αναδιάταξης ήδη υπαρχόντων σημείων βιολογικής πληροφορίας (114). Λόγω του υψηλού αριθμού αντιγράφων και ομολογίας αλληλουχίας, τα μεταθετά στοιχεία είναι ιδανικά για άνισο ομόλογο/εκτοπικό ανασυνδυασμό. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε διπλασιασμό ή απαλοιφή της αλληλουχίας που βρίσκεται μεταξύ δυο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που συμμετέχουν.

Η πιθανότητα να συμβεί ένα γεγονός ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον αριθμό των ομόλογων αλληλουχιών και από το μήκος των στοιχείων (115). Δημιουργούνται γενωμικές αναδιατάξεις που μπορεί να είναι επιβλαβείς, ευνοϊκές ή ουδέτερες. Ο εκτοπικός ανασυνδυασμός που προκύπτει από τα Alu έχει οδηγήσει σε δημιουργία 492 ανθρωπο-ειδικών απαλοιφών, η κατανομή των οποίων κλίνει προς τις γονιδιακά πλούσιες περιοχές του γονιδιώματος (107). Τα L1 επίσης συμμετέχουν στη δημιουργία σπασμάτων DNA στο γένωμα μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου ενδονουκλεασών, συμμετέχοντας στην επιδιόρθωση σχάσεων διπλής έλικας (116).

Γεγονότα ανασυνδυασμού εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες αλλά και σε περιπτώσεις καρκίνου. Η πρώτη ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου που συνδέθηκε με ασθένεια ήταν το 1980. Συγκεκριμένα, η ένθεση ενός αντιγράφου LINE-1, εντός του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα πήξης VIII, οδήγησε σε αιμορροφιλία A (16). Αυτό το εύρημα πυροδότησε πολυάριθμες έρευνες και, έκτοτε, αρκετές γενετικές ασθένειες συσχετίστηκαν με ενθέσεις (117). Γεγονότα ανασυνδυασμών Alu/Alu στα γονίδια MLH και BRCA1 συνδέονται με καρκίνο του παχέως εντέρου (HNPCC- *Hereditary non-polyposis colorectal cancer*) και μαστού, αντίστοιχα.

1.6.7 Μεταγωγή εκατέρωθεν αλληλουχιών

Η ικανότητα μεταγωγής 3'αλληλουχιών σε νέα θέση στο γένωμα βρέθηκε αρχικά για τα στοιχεία L1 (55, 118). Τα L1 έχουν αδύναμο σήμα πολυαδενυλίωσης

και για το λόγο αυτό, η RNA πολυμεράση κάποιες φορές το προσπερνά και τερματίζει τη σύνθεση RNA σε κάποιο καθοδικό σήμα πολυαδενυλίωσης. Υπολογίστηκε πως το 20% των ενθέσεων L1 περιλαμβάνουν άλλο γενωμικό DNA στο 3' άκρο τους. Το μήκος των αλληλουχιών που συμπαρασύρονται ποικίλει από μερικά ζεύγη βάσεων ως 1kb. Με τον τρόπο αυτό, οι L1 μεσολαβούμενες μεταγωγές έχουν την ιδιότητα να αναδιατάσσουν τα εξόνια και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες σε νέες γενωμικές θέσεις.

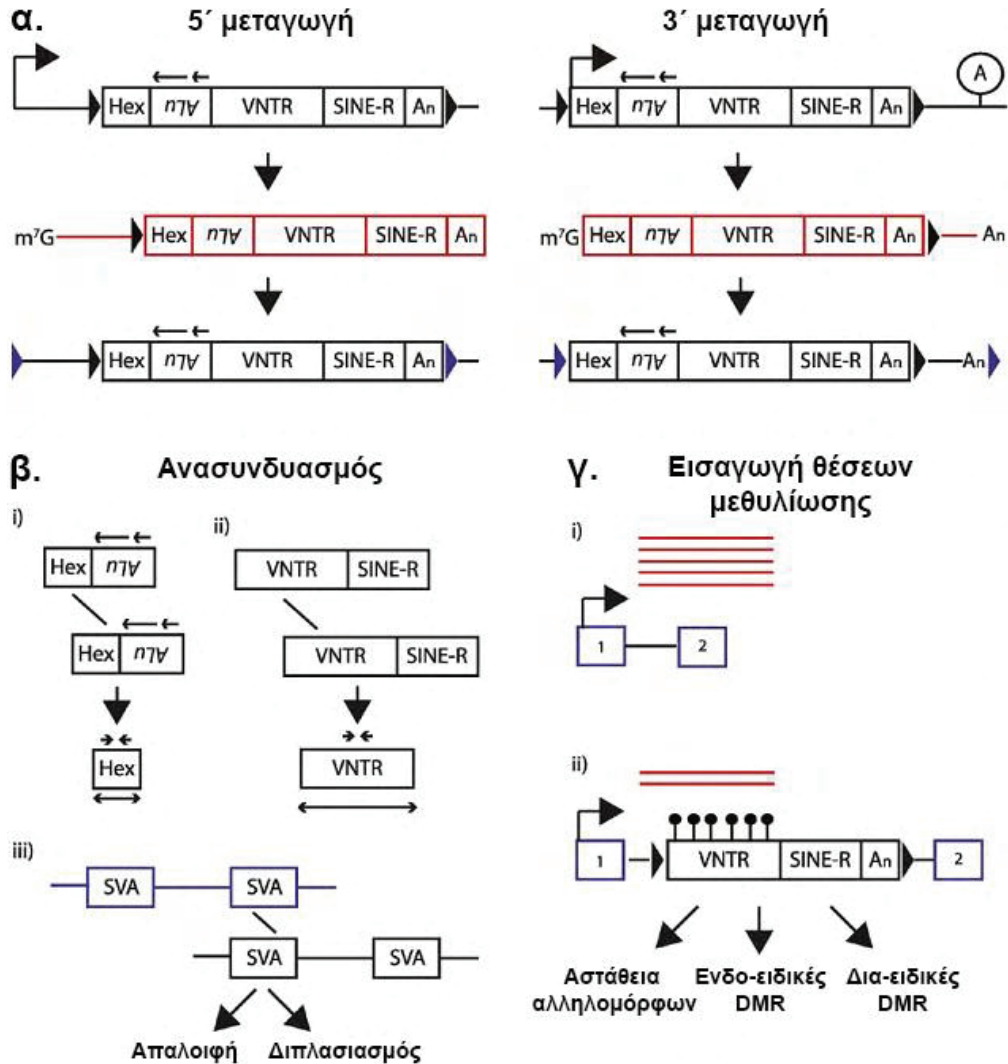
Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα στοιχεία SVA είναι επίσης ικανά να συμπαρασύρουν αλληλουχίες καθοδικά αυτών και υπολογίστηκε ότι περίπου το 10% των ανθρώπινων SVA εμπλέκονται σε τέτοια γεγονότα (31, 34). Επιπλέον, οι SVA μεσολαμβούμενες μεταγωγές μπορούν να λειτουργήσουν ως μηχανισμός για διπλασιασμό γονιδίων (46). Στην τελευταία περίπτωση νέες αλληλουχίες μπορούν να υπάρχουν είτε στην 5' είτε στην 3' περιοχή ενός SVA. Η 3' μεταγωγή συμβαίνει με τον τρόπο που προτάθηκε για το L1. Το μέγεθος των γενωμικών αλληλουχιών που μεταφέρονται μπορεί να είναι από μερικά ζεύγη ως και 1500 βάσεις. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μεταγωγή ενός ολόκληρου γονιδίου, του AMAC (Acyl-Malonyl condensing enzyme 1) στο γονιδίωμα των πιθήκων. Λόγω της 3' μεταγωγής, το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει 2 αντίγραφα του γονιδίου αυτού (46).

Ένα άλλο είδος μεταγωγής οδηγεί στην παρουσία νέων αλληλουχιών στο 5' άκρο του SVA. Η μεταγραφή του μεταθετού στοιχείου μπορεί να ξεκινήσει από οποιοδήποτε υποκινητή εδράζεται ανοδικά στη γενωμική αλληλουχία. Σε αυτή την περίπτωση ο τερματισμός της μεταγραφής συνήθως συμβαίνει σε ένα κανονικό σήμα πολυαδενυλίωσης εντός του μεταθετού στοιχείου. Αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση του προκύπτοντος cDNA στο γένωμα οδηγεί σε μια νέα ένθεση που φέρει στο 5' άκρο της το νέο τμήμα (119).

1.6.8 Εισαγωγή θέσεων μεθυλίωσης

Το DNA του SVA είναι γνωστό ότι μπορεί να μεθυλωθεί (120, 121) και η μεθυλίωση αυτή συμβαίνει πιθανότατα στην πλούσια σε G-C περιοχή VNTR. Ερευνητές που πραγματοποίησαν μια ευρεία ανάλυση του γενώματος για θέσεις μεθυλίωσης, υπογράμμισαν ότι οι αλληλουχίες SVA αποτελούν το 70% της βιβλιοθήκης τους και σημείωσαν ότι η περιοχή VNTR είναι πλήρως μεθυλωμένη σε ιστούς ενηλίκων (120). Λόγω των πολυμορφισμών που εμφανίζουν τα στοιχεία SVA

μεταξύ ανθρώπων αλλά και συγγενικών ειδών (36, 112) αποτελούν θέσεις διαφορικής μεθυλίωσης DMR (Differentially Methylated Region). Η λειτουργική σημασία της μεθυλίωσης έγκειται στο ότι συνδέεται με μείωση της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 1.11: Γενωμικός αντίκτυπος των SVA. α. Η εκκίνηση της μεταγραφής από ένα σημείο ανοδικά του SVA που τερματίζει μέσα στην αλληλουχία του, μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά 5' αλληλουχιών σε νέα γενωμική θέση έπειτα από ρετρομετάθεση του παραγόμενου RNA. Η διαδικασία αυτή ορίζεται ως 5' μεταγωγή. β. Τα SVA έχουν αδύναμο σήμα πολύ-A και η μεταγραφή μπορεί να συνεχίσει και να τερματίσει σε ένα πολύ-A καθοδικά. Έτσι, προκύπτει RNA που μεταφέρει και 3' αλληλουχίες (3' μεταγωγή). Τα στοιχεία SVA μπορεί να συμμετέχουν σε ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ των περιοχών i. εξαμερή, ii. VNTR ή iii. διαφορετικών στοιχείων SVA οδηγώντας σε διπλασιασμό ή απαλοιφή περιοχών. γ. Η περιοχή VNTR είναι γνωστό πως είναι ισχυρά μεθυλιωμένη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αστάθεια αλληλομόρφων με ενδο- και δια-ειδικές διαφορικά μεθυλιωμένες περιοχές DMR (Differentially Methylated Regions). Τροποποιημένη από (73).

1.7 Ασθένειες που συσχετίζονται με τα ρετρομεταθετά στοιχεία SVA

Τα SVA έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν έναν γενετικό τόπο τόσο σε επίπεδο DNA ή/και RNA όπως και στην επιγενετική του κατάσταση. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί στο ανθρώπινο γένωμα δεκατρείς απαλοιφές μεσολαβούμενες από SVA που έχουν οδηγήσει σε απαλοιφή 30.785 ζευγών βάσεων. Τα SVA μπορούν να εντεθούν σε περιοχές εντός ή εκτός γονιδίων. Ειδικότερα, εκείνα που εντοπίζονται σε ιντρόνια βρίσκονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε αντινοσηματική φορά (νοσηματική/ αντινοσηματική φορά: 1/4) κάτι που προτείνει ότι η νοσηματική φορά δεν έχει επιλεγθεί εξελικτικά λόγω αρνητικών επιπτώσεων στη γονιδιακή έκφραση. Ένας λόγος θα μπορούσε να είναι η παρουσία θέσεων ματίσματος στη νοσηματική φορά των στοιχείων SVA οι οποίες δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν η ένθεση έχει συμβεί σε αντίθετη φορά από αυτή του γονιδίου. Είναι πιθανό πως η ένθεση σε περιοχές που ρυθμίζουν το μάτισμα διαταράσσουν την πρόσδεση παραγόντων ματίσματος ή τη δευτεροταγή δομή του mRNA (7).

Από το σύνολο των SVA που έχει βρεθεί ότι προκαλούν ασθένεια, τα έξι βρίσκονται σε νοσηματική φορά. Μια κληρονομήσιμη ένθεση SVA στο γονίδιο κινάσης της τυροσίνης (BTK - Bruton's Tyrosine Kinase gene) διέκοψε την αλληλουχία ενός εξωνίου οδηγώντας σε υπερπήδηση εξωνίου, όπως ανιχνεύτηκε στο cDNA του ασθενούς (122). Η ένθεση διέκοψε το 5' σημείο ματίσματος στο εξώνιο 9 του γονιδίου BTK οδηγώντας σε απώλεια πρωτεΐνης και X-συνδεδεμένη α-γ-αιμοσφαιριναιμία. Αυτή η ένθεση SVA είχε μήκος 253 bp, περιελάμβανε μόνο την αλληλουχία του SINE-R με μια ουρά πολύ-A 92bp και ορίζονταν από επαναλήψεις της αλληλουχίας στόχου μήκους 16bp. Σε άλλη περίπτωση, μιας οικογένειας με ελλειπτοκυττάρωση – πυροποικιλοκυττάρωση, η ασθένεια συνδέθηκε με μια κολοβωμένη πρωτεΐνη α-σπεκτρίνης (OMIM #182860). Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε μια ένθεση 632bp που διέκοπτε το εξώνιο 5 της α-σπεκτρίνης που αφορούσε γεγονός 3' μεταγωγής SVA που είχε εντεθεί ανεστραμμένο (34, 47).

Έχουν περιγραφεί παραδείγματα όπου η ένθεση ενός SVA έχει συσχετιστεί με απώλεια έκφρασης mRNA. Ένα εξ' αυτών αφορά στην ένθεση ενός SVA μήκους 2.6 kb σε αντινοσηματική φορά, στο ιντρόνιο 32 του γονιδίου TAF1 που οδήγησε σε X-συνδεδεμένη δυστονία / παρκινσονισμό (XDP: X-linked Dystonia / Parkinsonism, OMIM #313650, #314250) [111]. Η μειωμένη έκφραση mRNA του TAF1 σε

κύτταρα ασθενών με XDP συνδέθηκε με υπερμεθυλίωση του DNA του SVA όπως φαίνεται από αναλύσεις περιορισμού με HpaIII/MspI [11]. Η μεθυλίωση αυτή λαμβάνει πιθανώς χώρα στο GC-πλούσιο VNTR και όπως έχει αποδειχθεί από μια έρευνα η περιοχή VNTR είναι πλήρως μεθυλιωμένη σε ιστούς ενηλίκων [112]. Αυτή η μεθυλίωση μπορεί και να οδηγεί σε μειωμένη έκφραση. Σε μια άλλη περίπτωση (123), η ένθεση κοντά στο 3' άκρο του ιντρονίου οδήγησε σε εξωνισμό ενός τμήματος 71bp της 5' περιοχής του SVA λόγω ματίσματος εντός της αλληλουχίας του. Πρόκειται για ένα κολοβωμένο στοιχείο SVA-F στο οποίο απουσιάζει η Alu-περιοχή και ξεκινά με μια περιοχή VNTR μήκους 1.6kb. Η παρουσία SVA στην ίδια μεταγραφική φορά με το γονίδιο μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογική μεταγραφή του αλλά και την ωρίμανση του mRNA.

Ενθέσεις SVA έχουν συσχετιστεί με απαλοιφή γενωμικού DNA, όπως έχει αναφερθεί για τα L1. Σε τρεις μη συσχετιζόμενες οικογένειες στην Ιαπωνία με λευχαιμικούς ασθενείς, η ένθεση ενός SVA μήκους 2kb οδήγησε σε απαλοιφή 14kb που περιελάμβανε όλο το γονίδιο HLA-A (124). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί δύο διαφορετικές περιπτώσεις Νευροϊνωμάτωσης-2, όπου στη μία, η θέση σπασίματος βρίσκεται εντός του SVA και στη δεύτερη εντός 400 ζευγών βάσεων του ίδιου SVA (125). Οποιαδήποτε από τις επαναλαμβανόμενες συνιστώσες αλληλουχίες του SVA έχει την πιθανότητα, ερχόμενη σε ομολογία με έναν άλλο γενωμικό τόπο που περιέχει όμοιο SVA ή επανάληψη, να οδηγήσει σε ανασυνδυασμό (NAHR). Η διαφορά στις περιοχές εξαμερών και VNTR μεταξύ δύο στοιχείων συμφωνεί με την παραπάνω πρόταση.

Επιπλέον, ενθέσεις SVA έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στη γονιδιακή έκφραση. Είναι χαρακτηριστική η περίπτωση ενός ασθενούς με αυτοσωμική υπολειπόμενη υπερχοληστερολαιμία ο οποίος ήταν ομόζυγος για μια ένθεση ενός SVA πλήρους μήκους στο 1^ο ιντρόνιο του γονιδίου LDLRAP (126). Η ένθεση αυτή λειτούργησε πιθανώς ως μεταγραφικός καταστολέας και είχε ως αποτέλεσμα την απουσία φυσιολογικού mRNA. Άλλη μια αρχαία ένθεση SVA, είναι υπεύθυνη για το 70% των περιπτώσεων της μυικής δυστροφίας Fukuyama (OMIM #607440, #253800) [113], μιας σπάνιας αυτοσωμικής υπολειπόμενης ασθένειας που περιγράφεται κυρίως στον πληθυσμό της Ιαπωνίας. Προκαλείται από μια ένθεση SVA στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου fukutin. Η παρουσία ενός αδύναμου σημείου δότη ματίσματος στο τελευταίο εξόνιο του γονιδίου και ενός δέκτη ματίσματος στο SVA οδηγεί σε παράλειψη του κανονικού κωδικονίου λήξης,

απαλοιφή των 38 τελευταίων αμινοξέων της φυσιολογικής πρωτεΐνης και προσθήκη 129 αμινοξέων που κωδικοποιούνται από την αλληλουχία SVA. Η φυσιολογική πρωτεΐνη εντοπίζεται στο Golgi ενώ η μεταλλαγμένη στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ένθεση ενός SVA-F σε αντινοσηματική φορά στα όρια 5^{ου} ιντρονίου και 6^{ου} εξωνίου του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του παράγοντα πήξης IX, ευθύνεται για την πρόκληση αιμορροφιλίας B. Η παρουσία του SVA αυτού φαίνεται πως διαταράσσει το φυσιολογικό μάτισμα του ιντρονίου οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση mRNA λόγω αποδόμησης (127). Τέλος, μια ένθεση SVA-E στο 8^ο ιντρόνιο του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της προ-κασπάσης 8 σχετίζεται με διαταραχή της μεταγραφής και ανωμαλίες στο μάτισμα (128).

Γονίδιο	Ένθεση (kb)	Υποικογένεια	Συσχετιζόμενη ασθένεια	Πιθανός μηχανισμός	Αλληλουχία SVA
<i>HLA-A</i>	2	<i>F1</i>	Λευχαιμία	Απαλοιφή	<i>AB291067</i> , <i>AB291066</i> (124)
<i>NF2</i>	1.7	<i>D</i>	Νευρονωμάτωση 2	Απαλοιφή	<i>Hg19</i> (125)
<i>BTK</i>	0.25	<i>N/A</i>	<i>X</i> -συνδεδεμένη α - γ -σφαιριναίμια	Υπερπήδηση εξωνίου	(122)
α - <i>spectrin</i>	0.63	<i>E</i>	Κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση ή/πυροποικιλοκύτωση	Υπερπήδηση εξωνίου	<i>dbRIP</i> (47)
<i>TAF1</i>	2.6	<i>F</i>	<i>X</i> -συνδεδεμένη δυστονία-Παρκινσονισμός	Μεθυλίωση DNA	<i>AB191243</i> (129)
<i>LDLRAP1</i>	2.6	<i>E</i>	Υπερχοληστερολαιμία	Μειωμένο mRNA	(126)
<i>Fukutin</i>	3.1	<i>E</i>	Μυϊκή δυστροφία <i>Fukuyama</i>	Μειωμένο mRNA	<i>AB185332</i> (130)
<i>PMS2</i>	2.2	<i>F</i>	Σύνδρομο <i>Lynch</i>	Απουσία πρωτεΐνης	(123)
<i>FIX</i>	2.5	<i>F</i>	Αιμορροφιλία B	Αποδόμηση mRNA	(127)
<i>CASP-8</i>	2.8	<i>E</i>	Έμμεση συσχέτιση με καρκίνο μαστού	Ανωμαλίες μεταγραφής/ματίσματος	(128)

Πίνακας 1.3: Ασθένειες που σχετίζονται με τα ρετρομεταθετά στοιχεία SVA. Ο πίνακας περιλαμβάνει τα γονίδια στα οποία έχουν γίνει οι ενθέσεις, η υποικογένεια στην οποία ανήκει κάθε στοιχείο SVA και το μήκος του καθώς και ο πιθανός μηχανισμός πρόκλησης ασθένειας.

1.8 Κυτταρικοί μηχανισμοί αποσιώπησης των μεταθετών στοιχείων

Η εξάπλωση των μεταθετών στοιχείων λαμβάνει χώρα όταν de novo ενθέσεις μεταφέρονται από τα γαμετικά κύτταρα στις επόμενες γενεές. Καθώς αποτελούν μια σημαντική απειλή για το γένωμα, οι μεταζωικοί ξενιστές έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τον περιορισμό της κινητικότητας των στοιχείων αυτών.

Η μεθυλίωση DNA είναι πιθανόν ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός που εμπλέκεται στη ρύθμιση των μεταθετών στοιχείων στη γαμετική σειρά των φυτών, των μυκήτων και των θηλαστικών (131). Αυτός ο κληρονομήσιμος, σχετικά σταθερός επιγενετικός μηχανισμός περιλαμβάνει ομοιοπολική προσκόλληση μιας μεθυλομάδας στον 5' άνθρακα της κυτοσίνης σε CG δινουκλεοτίδια, εμποδίζοντας τη μεταγραφή φέροντων και μη LTR μεταθετών στοιχείων. Τα περισσότερα μεταθετά στοιχεία είναι μεθυλιωμένα στις νησίδες CpG σε μη καρκινικά, διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα.

Οι μηχανισμοί αποσιώπησης των ξενιστών δρουν και μετα-μεταγραφικά. Για παράδειγμα, ο πρόωρος τερματισμός της μεταγραφής και το εναλλακτικό μάτισμα αναστέλλουν την έκφραση των LINE-1 (85, 86). Η οικογένεια ενζύμων επεξεργασίας RNA/DNA με δραστικότητα απαμινάσης της κυτοσίνης, γνωστά ως APOBECs (Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic polypeptide), έχει βρεθεί να αναστέλλει τα LINE-1, Alu και IAPs (132). Η αποσιώπηση των ρετροτρανσποζονίων από τις APOBECs δεν απαιτεί επεξεργασία προτείνοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να έχουν νέα λειτουργία πλέον της δράσης τους ως απαμινάσες κυτοσίνης.

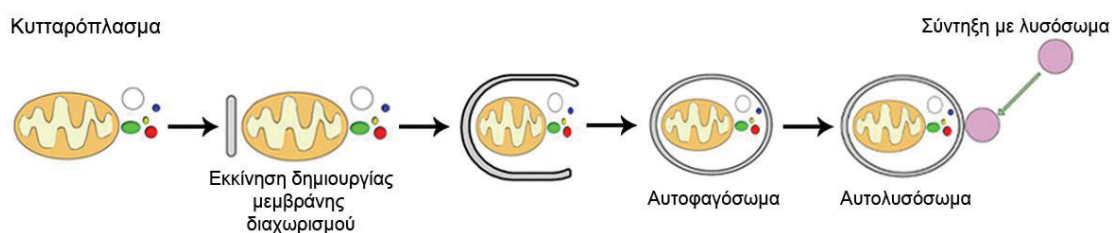
Πρόσφατα, έχει προταθεί μια νέα μορφή ελέγχου των μεταθετών στοιχείων που περιλαμβάνει τα miRNAs στα γαμετικά κύτταρα (133, 134). Στο μονοπάτι ελέγχου συμμετέχει μια τάξη μικρών RNA (piwi interacting RNAs) που προσδένονται στην οικογένεια των πρωτεϊνών Argonaute. Απουσία των Piwi πρωτεϊνών οδηγεί σε άρση αποσιώπησης των τρανσποζονίων (135). Τα προκύπτοντα από μεταθετά στοιχεία miRNAs ενσωματώνονται στη μηχανή RNAi και οδηγούν την καταστολή τους μέσω μεταγραφικής και μετα-μεταγραφικής αποσιώπησης που περιλαμβάνει τη μεθυλίωση του DNA και των ιστονών. Τα miRNAs αυτά προστατεύουν τα σωματικά κύτταρα από τη βλάβη DNA που επάγεται από την έκφραση ρετροτρανσποζονίων. Κατά τα αρχικά στάδια της ογκογένεσης, τα καρκινικά κύτταρα «επιλέγονται» ώστε να αποφεύγουν τη μεσολαβούμενη από

miRNA ρύθμιση. Η άρση της αποσιώπησης, η έκφραση και μετάθεση των μεταθετών στοιχείων οδηγεί σε βλάβες DNA που αυξάνουν τη γενωμική αστάθεια και συνεισφέρουν στην εξέλιξη του καρκίνου.

1.9 Κυτταρική ομοιόσταση και αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αναφέρεται σε ένα φαινόμενο ελέγχου-ρύθμισης της κυτταρικής ομοιόστασης όπου κυτταροπλασματικά συστατικά, λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και κατεστραμμένα οργανίδια διαχωρίζονται σε κυστίδια και μεταφέρονται στα λυσοσώματα για αποδόμηση κάτω από συγκεκριμένο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον (*Εικ. 1.12*). Τα προϊόντα αποδόμησης όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες και λιπίδια απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα για την σύνθεση νέων βιομορίων ή αποδομούνται περαιτέρω για παραγωγή ενέργειας (136-138). Η αυτοφαγία ενεργοποιείται απουσία θρεπτικών συστατικών αλλά έχει συνδεθεί και με άλλες φυσιολογικές διεργασίες όπως ανάπτυξη και διαφοροποίηση αλλά και παθολογικές καταστάσεις όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες, κυτταρικό στρες, ιική μόλυνση και καρκίνος.

Έχουν βρεθεί τρεις τύποι αυτοφαγίας: **α.** μικροαυτοφαγία (άμεσος διαχωρισμός κυτοσολικών συστατικών από λυσοσώματα (139)), **β.** μεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς (η hsc70 οδηγεί τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες προς το λυσόσωμα (140)) και **γ.** μακροαυτοφαγία (ογκώδης αποδόμηση με δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων/αυτολυσοσωμάτων) για την οποία και θα γίνει εκτενέστερη αναφορά. Τα γονίδια atg5 και atg7 (atg – autophagy related gene) θεωρούνται κομβικά (141) ωστόσο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι κύτταρα στα οποία απουσιάζουν, μπορούν να δημιουργήσουν αυτοφαγοσώματα/ αυτολυσοσώματα υπό συγκεκριμένες συνθήκες στρες (142).



Εικόνα 1.12: Η διαδικασία αυτοφαγίας. Ένα μέρος του κυτταροπλάσματος που περιλαμβάνει οργανίδια, πρωτεΐνες και άλλα μόρια αναγνωρίζεται ειδικά από πρωτεΐνες που συσχετίζονται με αυτοφαγία (Atg). Στη συνέχεια, μια διπλή μεμβράνη που επιμηκώνεται, περικλείει τα

συστατικά αυτά σε μια δομή που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα. Έπειτα, η σύντηξη αυτοφαγοσωμάτων με λυσοσώματα, που δημιουργεί τα αυτολυσοσώματα οδηγεί στην αποδόμηση των εσωτερικών συστατικών και παρέχει ενέργεια και άλλους δομικούς λίθους για βιοχημικές αντιδράσεις του κυττάρου.

Πάνω από 30 γονίδια και πρωτεΐνες συμμετέχουν στην αυτοφαγία. Τα βασικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη διαδικασία είναι τα τύπου I και III PI3K και το LKB1/AMPK. Επιπλέον, η p53, το Ras και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας. (143) Η βλάβη των μηχανισμών αυτοφαγίας είναι κοινή σε καρκίνους λόγω της απαλοιφής αντιγράφων των γονιδίων που την ελέγχουν (Beclin 1, Atg5, LC3) ή της μετάλλαξης των ρυθμιστών του αυτοφαγικού μονοπατιού (όπως το mTOR, TSC1/2, AMPK)(144). Η αναστολή της, σε αυτές τις περιπτώσεις, επιταχύνει τη δημιουργία βλαβών στο DNA και αυξάνει την πιθανότητα μεταλλάξεων στα καρκινικά κύτταρα. Απουσία της p53 και άλλων επιδιορθωτικών συστημάτων του DNA μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (145).

1.9.1 Ο ρόλος της πρωτεΐνης LC3

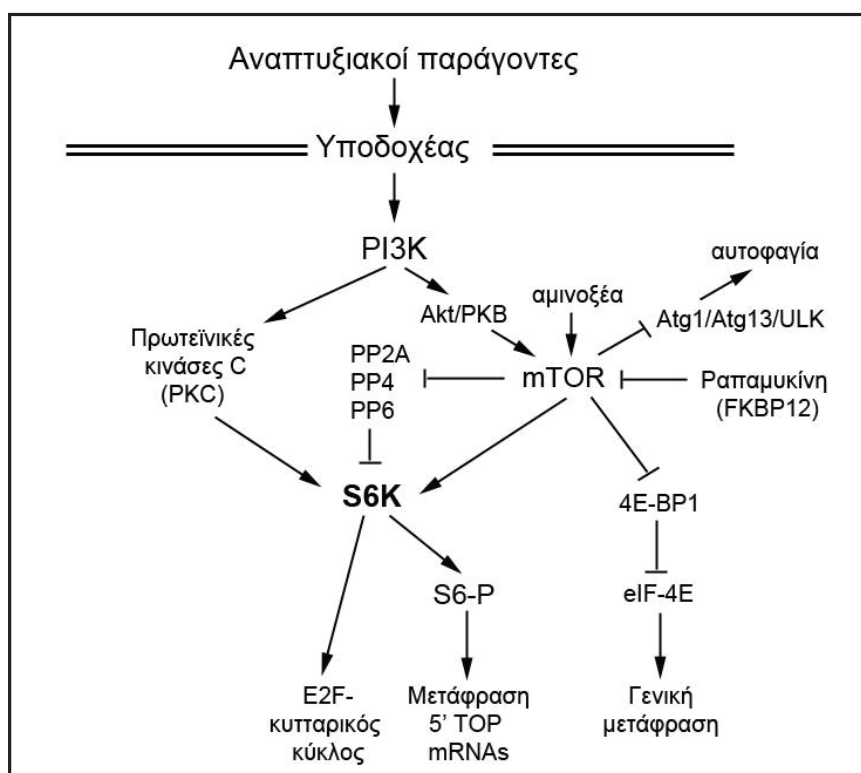
Η πρωτεΐνη που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους και ονομάζεται LC3 (Microtubule-associated protein light chain 3) χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο αυτοφαγίας. Η ενδογενής LC3 ανιχνεύεται σε δύο μορφές: η μία αντιπροσωπεύει την LC3-I που είναι κυτταροπλασματική και η άλλη την LC3-II που ενώνεται με φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), μια αντίδραση που απαιτεί τις πρωτεΐνες Atg7 και Atg10. Η LC3-II είναι παρούσα σε μεμβράνες αποκλεισμού και αυτοφαγοσώματα και πολύ λιγότερο σε αυτολυσοσώματα. Η πρόδρομη μορφή της LC3 δεν ανιχνεύεται υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς μετατρέπεται σε LC3-I από την Atg4 αμέσως μετά τη σύνθεση.

Αν και το μοριακό βάρος της LC3-II είναι μεγαλύτερο από αυτό της LC3-I, λόγω προσθήκης της ομάδας PE, η LC3-II μετακινείται γρηγορότερα από την LC3-I σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, λόγω του ότι είναι εξαιρετικά υδρόφοβη. Η μετατροπή λοιπόν της μιας μορφής στην άλλη αφορά την προσθήκη αυτής της ομάδας. Η LC3-I έχει μοριακή μάζα 16 kDa ενώ η LC3-II 14 kDa. Το ποσό της LC3-II σχετίζεται στενά με τον αριθμό των αυτοφαγοσωμάτων και είναι ένας συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης δημιουργίας τους.

1.9.2 Ο ρόλος της πρωτεΐνης p62

Η πρωτεΐνη p62 εντοπίζεται σε σωματίδια περιορισμού κυτταροπλασματικών υλικών που περιέχουν ουβικιτινιωμένα αθροίσματα πρωτεϊνών. Ελέγχει πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως φλεγμονώδεις αντιδράσεις μέσω διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων (146). Η p62 μεταφέρει πολυουβικιτινιωμένες πρωτεΐνες για αποδόμηση από το πρωτεάσωμα και το μηχανισμό αυτοφαγίας και είναι ένα βασικό συστατικό των πρωτεϊνικών αθροισμάτων που παρατηρούνται σε νευροεκφυλιστικές και ηπατικές ασθένειες (147, 148). Η έκφρασή της επάγεται από τη συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Τα αθροίσματα αυτά μπορεί να προέλθουν από οξειδωτικό στρες ή από αναστολή της πρωτεασωματικής δραστηριότητας.

Η μέτρηση της αποδόμησης της p62 αποτελεί έναν τρόπο ανίχνευσης αυτοφαγίας. Η p62 προσδέεται άμεσα στο κεντρικό συστατικό της αυτοφαγικής μηχανής, την πρωτεΐνη LC3 αλλά και σε ουβικιτινιωμένες πρωτεΐνες (149). Μεσολαβεί, κατά τον τρόπο αυτό, στην αναγνώριση των αθροισμάτων και στην εκκαθάρισή τους μέσω αυτοφαγίας (150, 151). Η συσσώρευση της p62 θα μπορούσε να αποτελεί, συνεπώς, δείκτη καταστολής της αυτοφαγίας.



Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση του καταρράκτη σηματοδότησης της κινάσης S6K που επάγεται από μιτογόνα. Φαίνεται επίσης η εμπλοκή άλλων μορίων στην ενεργοποίηση της S6K όπως και οι καθοδικοί της στόχοι. Τροποποιημένη από (152).

1.9.3 Ο ρόλος της κινάσης S6K και του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR

Η κινάση mTOR (mammalian Target of Rapamycin) αποτελεί μέρος των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 και, σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, θρεπτικά συστατικά και μιτογόνα (153) ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση, την πρωτεϊνοσύνθεση και τη δημιουργία ριβοσωμάτων (154). Ενεργοποιημένη mTOR (Akt και MAPK σηματοδότηση) αναστέλλει την αυτοφαγία ενώ η αρνητική ρύθμιση της κινάσης (APMK και p53 σηματοδότηση) την προάγει (*Εικ. 1.13*).

Για να είναι ενεργό το μονοπάτι mTOR απαιτείται να υπάρχουν στο κύτταρο επαρκή επίπεδα αμινοξέων. Διάφοροι τύποι κυτταρικού στρες όπως απουσία γλυκόζης, υποξία, βλάβες στο DNA και στρες ενδοπλασματικού δικτύου, μειορρυθμίζουν το μονοπάτι σηματοδότησης. Ειδικά κατά το ενεργειακό στρες και κατά την υποξία, μειώνονται τα επίπεδα ATP, αυξάνεται το κλάσμα AMP/ATP και ενεργοποιείται η AMPK ενώ στην περίπτωση βλάβης του DNA ενεργοποιείται η p53 και στη συνέχεια η AMPK. Και στις δύο περιπτώσεις, αναστέλλεται η λειτουργία του μονοπατιού mTOR. Το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκύπτει από τη συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και έχει ως αποτέλεσμα ο συνολικός ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης να μειώνεται.

Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S6K (κινάση S6) αποτελεί ένα από τα πρώτα υποστρώματα που φωσφορυλιώνει η κινάση mTOR. Η κινάση S6K ενεργοποιείται από πολλούς αυξητικούς παράγοντες και μιτογόνα (155) και φωσφορυλιώνει πληθώρα διαφορετικών στόχων, πολλοί από τους οποίους προάγουν την πρωτεϊνοσύνθεση και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (156). Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S6, ένα συστατικό της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S, αντιπροσωπεύει το εκτενέστερα μελετημένο υπόστρωμα της κινάσης S6K. Η S6K εμπλέκεται στη μετάφραση συγκεκριμένης κατηγορίας mRNA που περιλαμβάνουν μια ολιγοπυριμιδική αλληλουχία στο 5' άκρο τους (TOP – Terminal Oligopyrimidine Tract mRNAs). Η οικογένεια των 5' TOP mRNAs προκύπτει από τη μεταγραφή 100-200 γονιδίων. Τα μεταγραφήματα αυτά αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 20% των συνολικών κυτταρικών RNA και κωδικοποιούν τα συστατικά της μεταφραστικής μηχανής (152).

Η ραπαμυκίνη και τα ανάλογά της παρεμποδίζουν τη δράση του mTOR και κατά συνέπεια της κινάσης S6K και προάγουν την αυτοφαγία. Κατά τον τρόπο αυτό μειώνονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης S6 και ακολούθως η έκφραση

των 5' TOP mRNAs. Οι ανθεκτικές στη ραπαμυκίνη μορφές της κινάσης S6K δεν επιτρέπουν την αναστολή της μετάφρασης των 5' TOP mRNAs που επάγεται από μιτογόνα. Η αναστολή της S6K καταστέλλει τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Γενικότερα, διαταραχή της σηματοδότησης στο μονοπάτι mTOR-S6K οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία και ο καρκίνος (157).

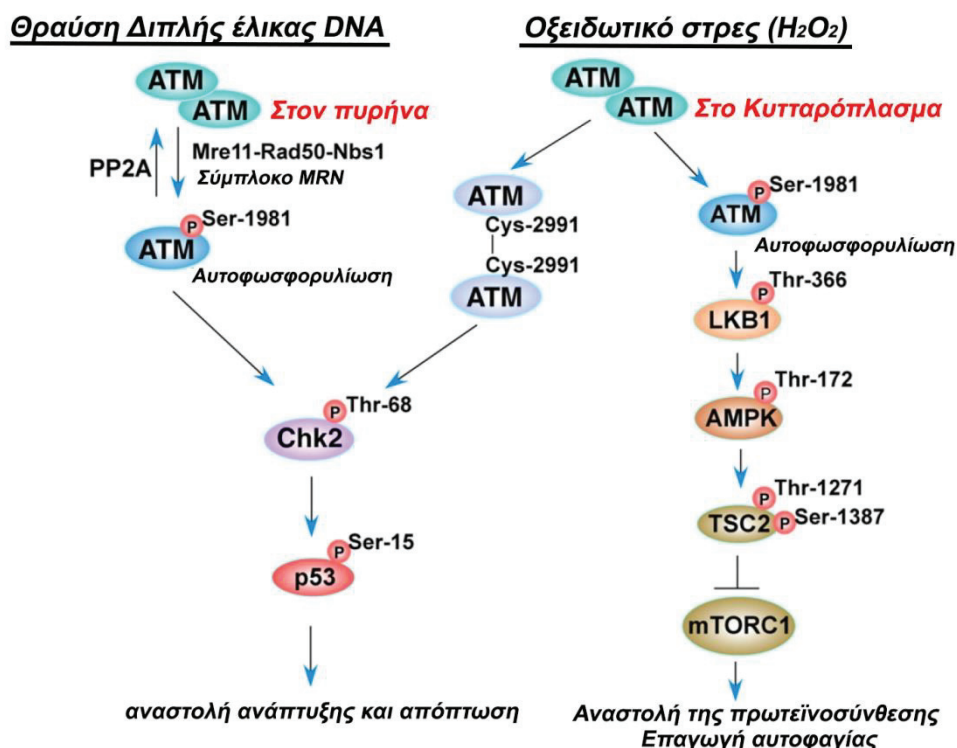
1.10 Παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου

1.10.1 Υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού. Χαρακτηρίζεται από ταχεία ανακύκλωση, έχοντας ιδιαίτερη βιολογική σημασία καθώς μεσολαβεί σε σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση (158-161). Καθώς δε φέρει ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων, δε θεωρείται ιδιαίτερα επιβλαβές αλλά συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες, μια κυτταρική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογικά, σταθερά υψηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (162). Η δημιουργία των ROS επιταχύνεται από την παρουσία σιδήρου μέσω πραγματοποίησης της αντίδρασης Fenton. Η αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες επηρεάζει ειδικότερα τα λυσοσώματα οδηγώντας σε γήρανση και απόπτωση (Εικ.1.14).

Η ποσότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου που απαιτείται για να ξεκινήσει κάποια βιολογική διαδικασία διαφέρει. Για παράδειγμα, η πρόκληση αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα θηλαστικών μπορεί να προκαλείται από ποσότητες που διαφέρουν μέχρι και 20 φορές σε διάφορες κυτταρικές σειρές (163). Διαφορετικά επίπεδα H₂O₂ εκκινούν διαφορετικά μοτίβα p53-ρυθμιζόμενης γονιδιακής έκφρασης: σε χαμηλά επίπεδα H₂O₂ τα ένζυμα με αντι-οξειδωτικό ρόλο μειώνουν το ποσό των ROS και προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες DNA, ενώ υψηλότερα επίπεδα H₂O₂ επάγουν την έκφραση προ-οξειδωτικών που εμπλέκονται στην απόπτωση. Είναι σημαντικό πως, ακόμη και στοιχειώδη επίπεδα ενδοκυτταρικού H₂O₂, αρκούν για να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση πληθώρας

γονιδίων – στόχων (164-166). Η συσσώρευσή του σε διάφορους κυτταρικούς τύπους που διεγείρεται από πολλούς αναπτυξιακούς παράγοντες συμβάλλει στην σηματοδότηση που εκκινείται από υποδοχείς, οξειδώνοντας σημαντικά κυστεϊνικά κατάλοιπα των πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης και της ογκοκατασταλτικής φωσφατάσης PTEN. Είναι αξιοσημείωτο πως το H_2O_2 μπορεί να μεσολαβήσει και να τροποποιήσει τον τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (167, 168).



Εικόνα 1.14: Απεικόνιση της επαγωγής σηματοδότησης της ATM έπειτα από επαγωγή οξειδωτικού στρες και δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Οι δίκλωνες θραύσεις DNA επάγουν το μονοπάτι της φωσφο-ATM-Chk2. Επιπρόσθετα το οξειδωτικό στρες επάγει ταυτόχρονα το μονοπάτι φωσφο-ATM-LKB1 και το μονοπάτι των ομοδιμερών ATM. Όπου: ATM: ataxia-telangiectasia mutated, LKB1: liver kinase B1, AMPK: AMP activated protein kinase; TSC2: tuberous sclerosis complex 2, mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1 (169).

1.10.2 Το βαρύ μέταλλο Αρσενικό

Το αρσενικό μπορεί να σχηματίσει τόσο ανόργανες όσο και οργανικές ενώσεις στο περιβάλλον και το ανθρώπινο σώμα. Αποτελεί μια καρκινογόνο ουσία και η έκθεση σε αυτό συνδέεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στον πνεύμονα, το δέρμα, το ήπαρ και τα νεφρά (170-173). Το αρσενικό προκαλεί σπασίματα στην αλυσίδα του DNA απόλεια μεθυλίωσης, ενδοκρινή διαταραχή και

κυτταρικό μετασχηματισμό (174-176). Επάγει επίσης οξειδωτικό στρες, γενεοτοξική βλάβη, αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA, μεταβολή στο επιγενετικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA και των ιστονών και ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (MAP κινάσες) οδηγώντας σε διαταραχή της γονιδιακής έκφρασης.

Το αρσενικό απαντάται στη φύση με σθένη οξείδωσης +5 και +3. Κατά την είσοδό του στα βιολογικά συστήματα η πλειοψηφία του αρσενικού ανάγεται στη μορφή +3. Το αρσενικό +3 μπορεί να αντιδράσει με τις σουλφυδρλικές ομάδες των πρωτεϊνών και να αναστείλει πολλά μεταβολικά μονοπάτια. Το αρσενικό +5 είναι ένα φωσφορικό ανάλογο που παρεμβαίνει στις αντιδράσεις φωσφορυλίωσης. Η τρισθενής μορφή του αρσενικού είναι βιολογικά πιο σημαντική σε σχέση με την πεντασθενή. Αυτό συμπεριλαμβάνει και την ικανότητα να επάγει την γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών.

Η πιο κοινή πηγή αρσενικού είναι το πόσιμο νερό. Η μέγιστη συγκέντρωση του αρσενικού που επιτρέπεται να υπάρχει στο πόσιμο νερό είναι το μέγιστο 0.01 mg/L (177). Σε ορισμένες περιοχές τα επίπεδα του αρσενικού ανέρχονται σε πολλές χιλιάδες φορές υψηλότερα του ορίου (178). Πέραν των καρκινογόνων αποτελεσμάτων του αρσενικού, αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σα φάρμακο για την αντιμετώπιση της οξείας προμυελωτικής λευχαιμίας (179). Οι Bode και Dong (180) υπέθεσαν ότι η επαγωγή των ERKs μπορεί να προάγει την αντικαρκινική δράση του αρσενικού ενώ η επαγωγή των JNKs μπορεί να ενισχύσουν την αντιαποπτωτική του ιδιότητα και συνεπώς την αντικαρκινική του δράση. Οι μεθυλιωμένες μορφές αρσενικού μπορούν να δράσουν ως συν-καρκινογόνα ή ως καρκινικοί προαγωγοί. Τόσο οι μεθυλιωμένες όσο και οι διμεθυλιωμένες ενώσεις που περιέχουν αρσενικό στην τρισθενή κατάσταση οξείδωσης είναι πιο γενεοτοξικές και πιθανοί αναστολείς της δραστηριότητας κάποιων ενζύμων.

Ο μηχανισμός με τον οποίο το αρσενικό προκαλεί καρκίνο δεν είναι διευκρινισμένος. Κατά την είσοδο του στο κύτταρο, το αρσενικό παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species), όπως σουπεροξειδίου (O_2^-) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (181). Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με καρκίνο. Η παραγωγή ROS φαίνεται να είναι μείζονος σημασίας, καθώς συνεπώαση αρσενικού με αντιοξειδωτικές ουσίες/”θηρευτές” ROS οδηγεί σε αναστολή της δράσης της ουσίας και προστασία του κυττάρου από βλάβες DNA (182). Η έκθεση σε

αρσενικό ενεργοποιεί πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες που μπορούν να προσδεθούν στο DNA. Αυτοί περιλαμβάνουν τους pF-kB, AP-1 και p53 (183).

1.11 Παράγοντες που επιδρούν στην επιγενετική κατάσταση του γενώματος

Οι διαταραχές στους επιγενετικούς μηχανισμούς επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και αποτελούν ένα από τα βασικά στοιχεία που δρουν σε συνδυασμό με άλλες γενετικές αλλαγές στην εξέλιξη του καρκίνου. Υπάρχουν δυο επιγενετικά συστήματα που επηρεάζουν την ανάπτυξη του οργανισμού και «εκπληρώνουν» το κριτήριο κληρονομικότητας: η μεθυλίωση του DNA και το σύμπλοκο πρωτεϊνών Pc-G/trx. Οι δύο πιο συχνά μελετημένες επιγενετικές αλλαγές στον καρκίνο είναι η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση ιστονών. Η ακετυλίωση μπορεί να ρυθμίσει την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA στρατολογώντας πρωτεΐνες με μοτίβο πρόσδεσης με ακετυλιωμένες λυσίνες (bromodomain). Συνολικά η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης οδηγεί σε αποσυσπείρωση του DNA, δίνει μεγαλύτερη πρόσβαση σε μεταγραφικούς παράγοντες και οδηγεί σε παρουσία μεταγραφικά ενεργών γενωμικών τόπων. Το φαινόμενο εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ ιστονικών ακετυλοτρανσφερασών και απο-ακετυλοτρανσφερασών (184).

1.11.1 5' Δεοξυ-αζακυτιδίνη

Η αζακυτιδίνη χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων μιας ετερογενούς ομάδας δυσλειτουργιών των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών (185), (186). Αποτελεί ένα ανάλογο νουκλεοζιδίων κυτιδίνης που ενσωματώνονται στο νεοσυντιθέμενο DNA. Εκεί, προσδέουν τις DNA μεθυλομεταφοράσες (DNMTs – DNA methyltransferases) με έναν μη αναστρέψιμο ομοιοπολικό τρόπο (187, 188). Η δέσμευση των DNMTs αποτρέπει τη διατήρηση της κατάστασης μεθυλίωσης του οδηγώντας σε απομεθυλίωση του DNA (189, 190). Ως συνέπεια, γονίδια που είχαν πρότινος αποσιωπηθεί λόγω υπεμεθυλίωσης του DNA μπορούν να ενεργοποιηθούν και να εκφραστούν μετά την κατεργασία των κυττάρων με αυτούς τους αναστολείς (191, 192). Η επανέκφραση των μεθυλιωμένων γονιδίων που εμπλέκονται: στον

φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και τα αποπτωτικά μονοπάτια συνεισφέρει στην αντικαρκινική δράση που παρουσιάζουν τα φάρμακα αυτά (193).

Η αζακυτιδίνη χρησιμοποιείται ευρέως για αιματολογικές κακοήθειες και οξείες λευχαιμίες όπου και παρατηρείται εκτεταμένη μεθυλίωση γονιδίων (194). Τα γονίδια που επηρεάζονται εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, την κυτταρική προσκόλληση, τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό θάνατο και υπερμεθυλίωσή τους έχει αναφερθεί σε πολλούς τύπους συμπαγών όγκων (195). Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα καθώς επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιώντας το μιτοχονδριακό και το μεσολαβούμενο από TNF αποπτωτικό μονοπάτι (196).

1.11.2 Βαλπροϊκό οξύ

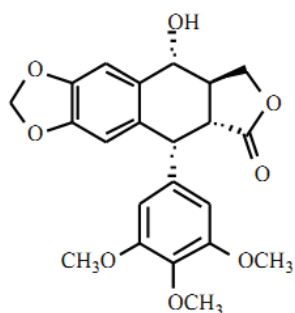
Το βαλπροϊκό οξύ (2-πρότυλ-πεντανοϊκό οξύ) είναι ένα μικρού μοριακού βάρους διακλαδισμένο λιπαρό οξύ το οποίο από το 1963 χρησιμοποιείται για τις αντι-επιληπτικές του δυνατότητες (197). Είναι ελαφρώς διαλυτό στο νερό και υψηλά διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Ο χρόνος ημιζωής του στον ορό είναι τυπικά 7-16 ώρες. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει τις απο-ακετυλάσες των ιστονών και να αλλάζει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης (198). Οι αποακετυλάσες υδρολύουν τις ακετυλομάδες που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες στις αμινομάδες των καταλοίπων λυσίνης όχι μόνο από τις ιστόνες αλλά και από άλλες πρωτεΐνες των οποίων η δραστηριότητα μπορεί να ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστική ακετυλίωση.

Έχει βρεθεί πως το βαλπροϊκό οξύ σε καρκινικά κύτταρα μαστού επάγει μια απαλοιφή διάφορων μελών της κατηγορίας των πρωτεϊνών που διατηρούν τη δομή της χρωματίνης, DNA μεθυλοτρανσφερασών και πρωτεϊνών ετεροχρωματινοποίησης που οδηγούν σε αποσυσπείρωση της χρωματίνης και αυξημένη ευαισθησία του DNA σε νουκλεάσες. Τα φαινόμενα αυτά αποτελούν καθοδικές συνέπειες της ακετυλίωσης ιστονών και είναι αντιστρεπτά μετά την αφαίρεση του φαρμάκου (199).

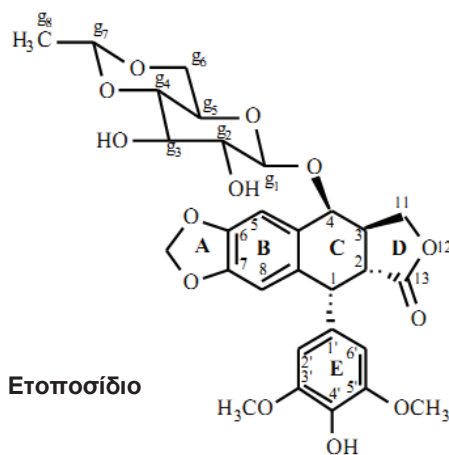
1.11.3 Ετοποσίδιο

Το ετοποσίδιο αποτελεί παράγωγο της ποδοφυλλοτοξίνης που εντοπίζεται στο φυτό *Rhodophyllum peltatum*. Η ποδοφυλλοτοξίνη έχει χρησιμοποιηθεί ενάντια σε

πολλές ασθένειες και χαρακτηρίζεται από αντιμιτωτικές ιδιότητες που σχετίζονται με την ιδιότητά της να αναστέλλει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (200). Ωστόσο το ετοποσίδιο δεν έχει αυτή την ιδιότητα. Αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα αντικαρκινικά φάρμακα στον κόσμο. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών τύπων κακοήθων νεοπλασμάτων όπως η λευχαιμία και οι όγκοι του εγκεφάλου, των πνευμόνων και του στομάχου.



Ποδοφυλλοτοξίνη



Ετοποσίδιο

Το ετοποσίδιο αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και είναι πολύ ενεργό σε κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της φάση S και στη G2 του κυτταρικού κύκλου. Ο αρχικός στόχος του στο κύτταρο είναι το ένζυμο Τοποϊσομεράση II. Αυτό το απαραίτητο για το κύτταρο ένζυμο διαχειρίζεται την υπο- και υπερσυσπείρωση του γενετικού υλικού απομακρύνει κόμβους από το γένωμα μέσω θραυσμάτων διπλής έλικας του DNA.

Το φάρμακο αυτό σταθεροποιεί το σύμπλοκο ενζύμου και κομμένου DNA που είναι απαραίτητο ενδιάμεσο στον καταλυτικό κύκλο της τοποϊσομεράσης II. Η συσσώρευση τέτοιων συμπλόκων στα κύτταρα οδηγεί σε δημιουργία μόνιμων σχάσεων του DNA ενεργοποιώντας τελικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Έτσι, το ετοποσίδιο μετατρέπει αυτό το σημαντικό ένζυμο σε μια εν δυνάμει κυτταρική τοξίνη που κατακερματίζει το γένωμα (201). Συγκέντρωση 100μM προκαλεί σημαντική αναστολή της πρόσληψης ουριδίνης και θυμιδίνης σε κύτταρα HeLa.

1.12 Σημαντικοί δείκτες κυτταρικής διαφοροποίησης

1.12.1 Το αντιγόνο CD133 ως δείκτης καρκινικών βλαστικών κυττάρων

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν μόλις το 1% μιας καρκινικής εστίας αλλά είναι τα μόνα κύτταρα ικανά να δημιουργήσουν έναν νέο όγκο. Η εξειδικευμένη έκφραση δεικτών επιφανείας μπορεί να διαχωρίσει τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα στη μάζα του όγκου, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου (202).

Αυξανόμενες ενδείξεις αποκαλύπτουν ότι ένας όγκος αποτελείται από ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς όσο αφορά την έκφραση των αντιγόνων επιφανείας όπως και τη δυνατότητά τους να δημιουργούν αποικίες *in vitro*. Δύο μοντέλα έχουν προταθεί ώστε να εξηγήσουν την ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων. Το στοχαστικό ή μοντέλο κλωνικής εξέλιξης προτείνει ότι κάθε καρκινικό κύτταρο είναι ένας πιθανός εκκινητής νέου όγκου, όμως η ετερογένεια προκύπτει από εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες από σπάνια στοχαστικά γεγονότα. Αντίθετα, το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων προτείνει ότι η ετερογένεια είναι αποτέλεσμα μιας ιεραρχικής οργάνωσης παρόμοιας με την εμβρυονική ή η σωματική, προερχόμενη από βλαστικά κύτταρα οργανογένεση (203).

Το κυτταρικό αντιγόνο επιφάνειας CD133 (γνωστό ως AC133 ή prominin-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που έχει αναγνωριστεί ως ένας ειδικός δείκτης για καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CD133 ελέγχεται από 5 υποκινητές. Ο 1^{ος} υποκινητής διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως Oct4, SRY και CREB. Έχουν βρεθεί 14 εναλλακτικά ματισμένα μεταγραφήματα από τους υποκινητές αυτούς που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους με αλληλοεξαρτώμενο τρόπο. Η βιολογική λειτουργία και η ρύθμιση του γονιδίου παραμένουν ασαφή.

Ο δείκτης CD133 ανιχνεύεται σε νευροεπιθηλιακά και αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ενώ έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του αυξάνεται σε κακοήθειες όπως το γλοίωμα, το μελάνωμα, το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του ήπατος, του παχέως εντέρου, των ωοθηκών και των πνευμόνων (204). Όσο αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, έχει βρεθεί ότι οι πληθυσμοί CD133+ έχουν τη δυνατότητα να εκκινούν τη δημιουργία όγκων. Έχει υποστηριχθεί ότι η ρύθμιση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της κατάστασης διαφοροποίησης των CD133-θετικών κυττάρων ελέγχεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt (205). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια

Notch, Hedgehog και BMP έχουν επίσης εμπλακεί στη ρύθμιση των CD133 θετικών καρκινικών βλαστικών κυττάρων (206).

1.12.2 *Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2*

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Sox (Sry- related HMG Box) και είναι απαραίτητος ώστε τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα να διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης και πολυδυναμικότητας (207, 208). Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που επενδύουν την αναπνευστική οδό, εκκινείται από τη σηματοδότηση του Sox2 στα βλαστικά-προγονικά κύτταρα πνεύμονα (209, 210). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής συσχετίζεται με καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού κάτι που προτείνει έναν ογκογόνο ρόλο για το Sox2 (211, 212).

Η μεταγραφή του Sox2 μπορεί να επηρεάζεται από εξωγενή ερεθίσματα που προάγουν χρωμοσωμική αστάθεια και οδηγούν σε ενίσχυση της έκφρασής του. Αν και προκύπτει μόνο ένα μετάγραφο μετά τη μεταγραφή του γονιδίου, αυτό υπόκειται σε μεταγραφικές με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Σε μεταγραφικό επίπεδο, έρευνες απέδειξαν ότι το miRNA-145 μπορεί να αναστείλει τα καθοδικά αποτελέσματα του Sox2. Τα επίπεδα του miRNA-145 σε ανθρώπινα αυτό-ανανεώσιμα βλαστικά κύτταρα είναι χαμηλά ενώ αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση. Τα γεγονότα αυτά προτείνουν ότι το miRNA-145 αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων πολυδυναμίας μέσω καταστολής των Oct4, Sox2 και του Klf4 και το ίδιο αναστέλλεται από τον Oct4 (213).

1.12.3 *Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4*

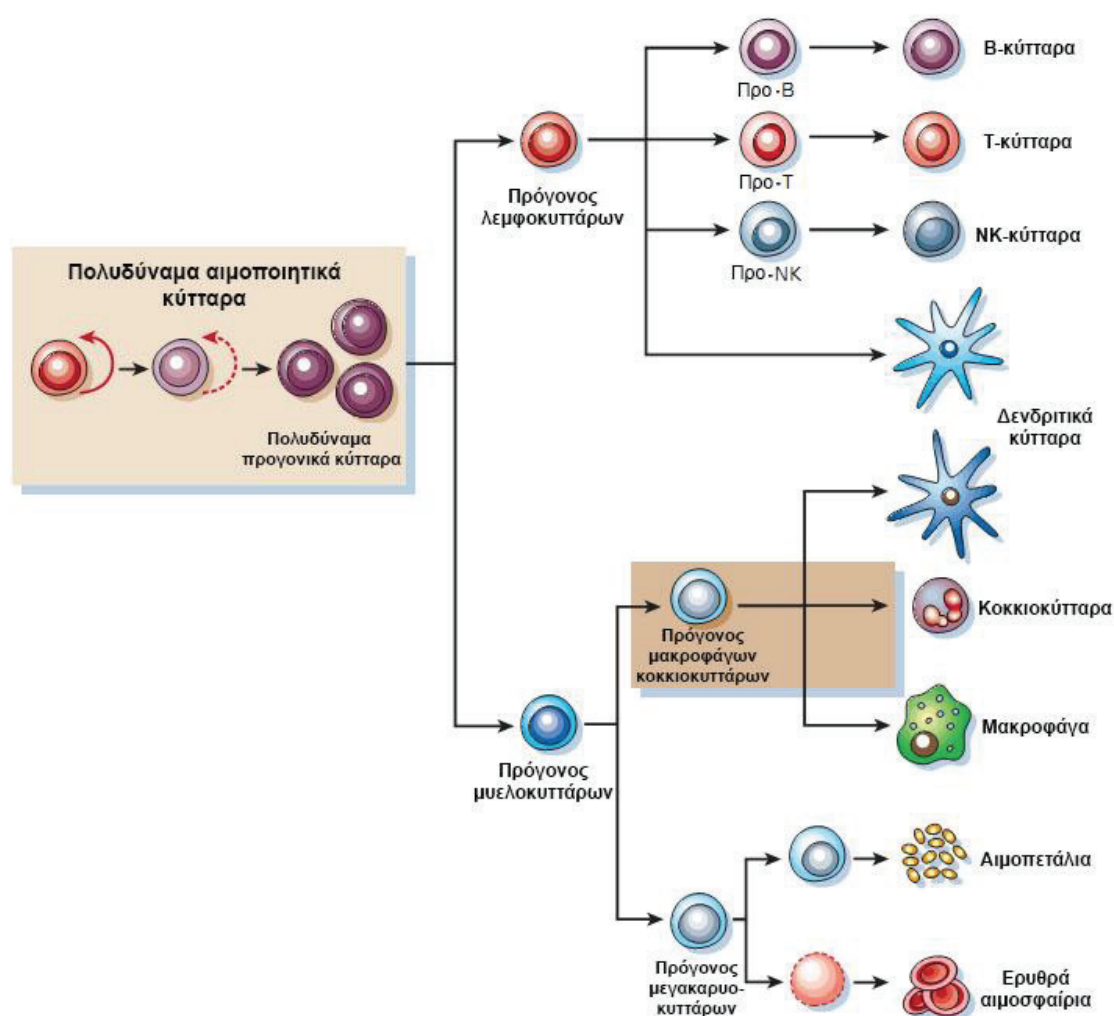
Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων POU (Pit-Oct-Unc) και διακρίνεται από το μείζονα ρόλο του στην αυτό-ανανέωση και την πολυδυναμία των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και των κυττάρων εμβρυονικού καρκινώματος (214, 215). Διαφορετικά επίπεδα Oct-4 επάγουν διαφορετικά αναπτυξιακά προγράμματα. Η μείωση της έκφρασης του Oct4 στο αναπτυσσόμενο έμβryo ή σε εμβρυονικά βλαστικά και καρκινικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού που βρίσκονται σε καλλιέργεια οδηγεί σε απώλεια πολυδυναμίας και σε διαφοροποίηση σε τροφοεκτόδερμα (216) ενώ η υπερέκφρασή του οδηγεί στη

διαφοροποίηση των εμβρυονικών κυττάρων σε ενδοδερμικές ή μεσοδερμικές δομές (217, 218).

Το ανθρώπινο γονίδιο Oct4 εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και μπορεί να κωδικοποιήσει 2 ισομορφές, το Oct4A και Oct4B που διαφέρουν στο αμινικό τους άκρο (219). Το Oct4A εντοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων ενώ το Oct4B βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (220). Η έκφραση του Oct4 έχει βρεθεί σε διάφορους σωματικούς ιστούς ενηλίκων (221), όπου περιορίζεται σε μικρούς πληθυσμούς πολυδύναμων κυττάρων, σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε πρωτογενείς όγκους (222). Προσφάτως, έχει αναφερθεί έκφραση του Oct4 σε τελικώς διαφοροποιημένα περιφερειακά κύτταρα αίματος (223). Αν και η αναγνώριση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων δεν ήταν εύκολη υπόθεση, βρέθηκε ότι ο παράγοντας Oct4 ενεργοποιεί το παράγοντα FGF-4 (Fibroblast Growth Factor-4), το προσκολλητικό μόριο Osteopontin και το μεταγραφικό παράγοντα Rex-1.

1.13 Κατηγοριοποίηση λευχαιμιών

Η λευχαιμία είναι ένας τύπος καρκίνου του αίματος και ανήκει στο ευρύτερο φάσμα των αιματολογικών νεοπλασιών. Χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος και ειδικότερα των λευκοκυττάρων, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της αναλογίας των λευκών αιμοσφαιρίων προς τα ερυθρά από 1:500 σε 1:20. Κλινικά και παθολογικά κατηγοριοποιείται αρχικά, σε οξεία και χρόνια λευχαιμία ενώ, ανάλογα με τον προσβαλλόμενο τύπο κυττάρου, σε λεμφοβλαστική και μυελογενή λευχαιμία (224).



Εικόνα 1.15: Διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων σε κύτταρα του αίματος. Ένα αρχέγονο, πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο μπορεί μέσω ενδιάμεσων πρόδρομων κυττάρων να καταλήξει σε οποιονδήποτε από τους εικονιζόμενους τύπους κυττάρων. Τροποποιημένη από (202)

Η αιμοποίηση (*Εικ. 1.15*) είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από εναλλακτική έκφραση ειδικών μεταγραφικών ρυθμιστών, αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, ο συνδυασμών των οποίων καθορίζει την πορεία της κυτταρικής διαφοροποίησης (225). Τα πολύπλοκα βιολογικά φαινόμενα που συμμετέχουν στη δημιουργία λευχαιμικού φαινοτύπου παραμένουν άγνωστα σε μεγάλο βαθμό αλλά η ανάλυση συσχετιζόμενων με λευχαιμία χρωμοσωμικών μετατοπίσεων έχει βοηθήσει στη διαλεύκανση βασικών σημείων κατά τη λευχαιμογένεση.

1.13.1 Βασικά χαρακτηριστικά Οξείας Λευχαιμίας

Χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση του αριθμού των αδιαφοροποίητων κυττάρων αίματος και τη συσσώρευσή τους στο μυελό των οστών, εμποδίζοντας την παραγωγή φυσιολογικών κυττάρων. Ένα πρόδρομο κύτταρο λεμφοειδούς ή μυελικής σειράς μπορεί να συσσωρεύσει γενετικές αλλαγές οι οποίες αναστέλλουν την κυτταρική διαφοροποίηση οδηγώντας σε οξεία λεμφοβλαστική ή οξεία μυελογενή λευχαιμία αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να συνδέεται με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και μειωμένη απόκριση σε αποπτωτικά ερεθίσματα. Στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, κακοήθη, αδιαφοροποίητα λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται στο μυελό των οστών. Στη δεύτερη περίπτωση, η οξεία μυελογενής λευχαιμία προκαλείται από επιφόρτιση του φυσιολογικού μυελού των οστών από λευχαιμικά κύτταρα επιφέροντας μείωση στα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια. Η οξεία λευχαιμία εκδηλώνεται με συμπτώματα κόπωσης, δύσπνοιας και συχνή εμφάνιση λοιμώξεων.

Η ποικιλομορφία και η ετερογένεια της λευχαιμίας πηγάζει από το γεγονός ότι η λευχαιμική εξαλλαγή μπορεί να λάβει χώρα σε διαφορετικό, κάθε φορά, στάδιο του μονοπατιού διαφοροποίησης. Ανάλυση του καρυοτύπου λευχαιμικών ασθενών έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και αναστροφές είναι παρούσες σε πολλές περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας. Οι πιο συχνοί «στόχοι» τέτοιων γεγονότων είναι γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς ρυθμιστές οπότε μετά από ανασυνδυασμό, προκύπτουν υβριδικές πρωτεΐνες σύντηξης με τροποποιημένες ιδιότητες. Αυτοί οι τροποποιημένοι μεταγραφικοί παράγοντες που εντοπίζονται σε συγκεκριμένους υποτύπους οξείας λευχαιμίας, παρεμβαίνουν σε μεταγραφικά δίκτυα που είναι σημαντικά για την αιμοποίηση. Για παράδειγμα, η μετατόπιση t(15;17)

παράγει μια πρωτεΐνη σύντηξης PML/RARa που προσδένεται στον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος στους υποκινητές διάφορων μυελο-ειδικών γονιδίων και αναστέλλει τη μυελική διαφοροποίηση.

Έχει περιγραφεί ένας μεγάλος αριθμός χρωμοσωμικών μετατοπίσεων στην οξεία λευχαιμία (226). Οι πιο συχνές είναι οι t(8;21), t(15;17), inv(16) και t(9;11) που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες σύντηξης AML/ETO, PML/RARa, CBFβ/SMMHC και MLL/AF4 και ευρίσκονται στο 40% των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας (227). Άλλες μετατοπίσεις όπως οι t(3;5), t(6;9), t(16;21), t(7;1), είναι παρούσες σε λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων. Τυχαίες χρωμοσωμικές ανωμαλίες εντοπίζονται στο 30% των περιπτώσεων ενώ στο υπόλοιπο 20%, ο καρυότυπος των ασθενών είναι φυσιολογικός.

1.13.2 Βασικά χαρακτηριστικά χρόνιας λευχαιμίας

Χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση ανώριμων κυττάρων του περιφερικού αίματος. Τυπικά απαιτούνται μήνες ή και χρόνια για την εξέλιξή της και τα κακοήθη κύτταρα παράγονται με μεγαλύτερο ρυθμό συγκριτικά με τα φυσιολογικά καταλήγοντας στην αύξηση των κακοήθων λεμφοκυττάρων στο αίμα. Κατ' αντιστοιχία με την οξεία, διακρίνονται δύο τύποι χρόνιας λευχαιμίας: η λεμφοβλαστική (ανώμαλη νεοπλαστική διαφοροποίηση των B ή T λεμφοκυττάρων) και η μυελογενής (ανωμαλία βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών όπου ο πολλαπλασιασμός των κοκκιοκυττάρων πολυμορφοπύρηνων είναι το κύριο χαρακτηριστικό). Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία συσχετίζεται με μια χαρακτηριστική χρωμοσωμική ανωμαλία, το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας [t(9;22)(q34;q11)].

1.13.3 Λευχαιμία και ρετρομεταθετά στοιχεία

Το 1992 αναφέρθηκε υπομεθυλίωση των LINE-1 σε ανθρώπινη χρόνια B λεμφοβλαστική λευχαιμία (228, 229). Το 2005 προσδιορίστηκε υπομεθυλίωση των LINE-1 στο 75% των αρχικών σταδίων και στο 40% πιο προχωρημένων σταδίων της χρόνιας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Επίσης βρέθηκε υπομεθυλίωση LINEs και Alu στο πολλαπλό μνέλωμα και σε πλασματοκυτταρικές λευχαιμίες (230). Το αν η υπομεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων είναι αποτέλεσμα της νεοπλασίας ή ο

αιτιατός παράγοντας που προάγει την κλωνική εξέλιξη στις κακοήθειες αυτές, παραμένει άγνωστο.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί εξωνισμός ενός Alu που βρίσκεται στο 1^ο ιντρόνιο του γονιδίου TIF-A1 και το τροποποιημένο μεταγράφημα ανιχνεύθηκε σε αρκετές λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (κυρίως στα 293T, HL60, Dami, U937, KMH2, MT4, CMK, Dg-75, Daudi, και REH), ενώ η παρουσία του ίδιου στοιχείου Alu δεν οδήγησε σε εξωνισμό σε άλλες λευχαιμικές σειρές (Jurkat, Molt3, Raji, K562) και στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς [82].

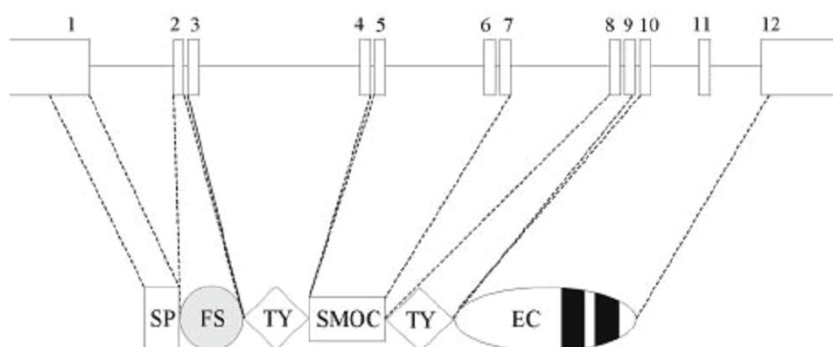
Το γονίδιο MLL που συμμετέχει σε αρκετά γεγονότα μετατόπισης που σχετίζονται με λευχαιμία, κωδικοποιεί για μια μεθυλοτρανσφεράση (H3K4) που ρυθμίζει, μεταξύ άλλων, την έκφραση των γονιδίων HOX και η δυσλειτουργία της συνδέεται με φτωχή πρόγνωση. Το γονίδιο MLL φέρει πολλά στοιχεία Alu στην αλληλουχία του και τα σημεία σπασίματός του συμπεριλαμβάνουν Alu ή βρίσκονται κοντά σε Alu (231, 232). Οι αλλαγές αυτές δεν είναι γνωστό αν αποτελούν την αιτία ή είναι αποτέλεσμα της καρκινογένεσης αλλά φαίνεται ότι είναι ογκογόνες μόνο όταν συμβαίνουν σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρου με δυναμικό καρκινικού βλαστικού κυττάρου ή συνυπάρχουν με άλλες γενετικές βλάβες.

1.14 Χαρακτηριστικά του γονιδίου SMOC-1

Το γονίδιο SMOC-1 (Secreted Modular Calcium-binding protein 1) ευρίσκεται σε ένα αντίγραφο στο χρωμόσωμα 14 του ανθρώπινου γενόματος και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, BM-40. Οι πρωτεΐνες BM-40 επηρεάζουν μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται: **α.** η κυτταρική σηματοδότηση από αναπτυξιακούς παράγοντες όπως οι VEGF και PDGF, **β.** η κυτταρική μετανάστευση, **γ.** η κυτταρική προσκόλληση και **δ.** ο πολλαπλασιασμός (233). Στην *Εικ. 1.16* απεικονίζεται η δομή του γονιδίου SMOC-1 καθώς και οι περιοχές (domains) από τις οποίες απαρτίζεται η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται η περιοχή EC που προσδένει με μεγάλη συγγένεια ιόντα ασβεστίου καθώς και διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου.

Ανάλυση κατά Northern σε διαφορετικούς ιστούς ενήλικου ποντικού, απέδειξε έκφραση RNA του SMOC1 στις ωοθήκες, τον εγκέφαλο, το θύμο, την

καρδιά, το σκελετικό μυ, το συκώτι και τον πνεύμονα. Έχει βρεθεί ότι η απαλοιφή έκφρασής του (knockdown) μειώνει τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και τα ποσοστά του ασβεστίου, αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (234). Είναι ενδιαφέρον ότι, σε μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με χρόνια μυελογενή λευχαιμία έχει παρατηρηθεί μειωμένη ενδοκυτταρική ροή ασβεστίου (235). Αντιθέτως, υπερέκφραση του SMOC-1 αυξάνει τη δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης καθώς και την έκφραση δεικτών διαφοροποίησης των οστεοβλαστών.



Εικόνα 1.16: Δομή εξονίων – ιντρονίων στο ανθρώπινο γονίδιο SMOC-1. Τα εξόνια αριθμούνται από 1 ως 12 ενώ οι ενδιάμεσες γραμμές αντιστοιχούν στα ιντρόνια. Τα κουτιά 1 και 12 παρουσιάζονται ανοικτά καθώς τα ακριβή όρια του γονιδίου δεν έχουν διευκρινιστεί. Στην πρωτεΐνη διακρίνονται οι εξής περιοχές, SP: Signal Peptide - πεπτίδιο σηματοδότησης, FS: Follistatin like περιοχή, SMOC: η περιοχή που διαφοροποιεί την πρωτεΐνη σε σχέση με τις άλλες της οικογένειας BM-40, TY: Thyroglobulin-like περιοχή, EC: Extracellular Calcium-binding domain –εξωκυτταρική περιοχή πρόσδεσης ασβεστίου (236).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα SVA είναι σύνθετα, ανθρωπο-ειδικά ρετροτρανσποζόνια που αριθμούν ~2800 αντίγραφα στο ανθρώπινο γένωμα. Έχουν ήδη συσχετιστεί με αρκετές ασθένειες και κάποιες υπο-οικογένειες θεωρούνται ρετρομεταθετικά ενεργές. Ωστόσο, τα δεδομένα για τη μεταγραφική ρύθμισή τους είναι ελλιπή και ενώ έχουν γίνει προσπάθειες κλωνοποίησης SVA πλήρους μήκους, δεν έχει απομονωθεί κάποιο με τη δυνατότητα να ρετρομετατίθεται με μεγάλη συχνότητα.

Στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- η κλωνοποίηση RNA-εκφραζόμενων SVA από λευχαιμικούς ασθενείς σκοπό τον καθορισμό της γενωμικής τους θέσης
- η απομόνωση και σήμανση της αλληλουχίας DNA ενός πλήρους μήκους στοιχείου SVA που εκφράζεται σε λευχαιμικά κύτταρα
- η εξέταση της ικανότητας ρετρομετάθεσης SVA σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές μεταξύ των οποίων και λευχαιμικές
- η μελέτη της πιθανής κινητοποίησης SVA από παράγοντες που προκαλούν: **α.** οξειδωτικό στρες και **β.** επιγενετικές τροποποιήσεις
- η διερεύνηση πιθανών επιπτώσεων των μεταλλαξιγόνων ρετρομεταθετικών γεγονότων SVA στη βιωσιμότητα και το φαινότυπο των κυττάρων.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά υλικά

2.1.1 Αναλώσιμα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αναλώσιμα υλικά των κάτωθι εταιριών: Φλάσκες πολυστυρενίου κυτταροκαλλιέργειας: Corning[®], Cellstar[®], Greiner Bio-one. Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας: (διαμέτρου 2, 6 και 10 cm) Cellstar[®], Greiner Bio-one, Orange Scientific. Βακτηριακά τρυβλία: Greiner Bio-one Πιπέτες Pasteur: Brand GMBH. Πιπέτες πλαστικές κυτταροκαλλιέργειας: (Χωρητικότητας 5- και 10 ml) Corning[®], Φυγοκεντρικοί σωλήνες UNIVERSAL: Greiner Bio-one. Φιαλίδια 1 ml για φύλαξη κυττάρων σε δοχείο υγρού αζώτου: NUNC International. Φυγοκεντρικοί σωλήνες 15 ml: Orange Scientific.

2.1.2 Λοιπά αντιδραστήρια

Απομόνωση RNA: QIAamp RNA Blood Mini Kit της QIAGEN. Παρασκευή cDNA: Hemavision RT της DNA Technology A/S. Ταυτοποίηση χρωμοσωμικών μετατοπίσεων: Hemavision Screen της DNA Technology A/S. Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης: MiniElute Gel Extraction Kit της QIAGEN. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA: Plasmid DNA Purification NucleoSpin της Macherey-Nagel. DNA Πολυμεράσες: Taq DNA polymerase της InvitrogenTM / HyTest

2.1.3 Εξοπλισμός

Αυτόκαυστο: AES, Raypa. Τροχιακός επωαστήρας: G25, New Brunswick Scientific co. Inc. Ξηρός κλίβανος: Memmert. Υδατόλουτρο: JULABO 7A. Επιτραπέζια φυγόκεντρος: Hettich, Universal II. Μικροφυγόκεντρος: Centrifuge 5415D, Eppendorf. Φωτόμετρο: Gene-Quant, Pharmacia. Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας: UV transilluminator, Ultra Violet Products Inc. Φωτογραφική μηχανή: Nikon CoolPix 990. Επωαστικός κλίβανος ευκαρυωτικών κυττάρων: Forma Scientific, CO2 Water-jacketed Incubator. Εστία κάθετης νηματικής ροής: AURA 200 MAC, BioAir Instruments. Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης (Electroporator): BTX ECM 630 Κυτταρόμετρα ροής: FACS Calibur, Becton Dickinson και Flomax, PARTEC.

Μικροσκόπιο φθορισμού: Nikon eclipse E400. Φασματοφθορισμόμετρο: F-2500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer. Θερμοκυκλοποιητής: DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer. Ηλεκτροφορητική συσκευή: Biorad. Συσκευή εμφάνισης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης κατά Western: Molecular Imager ChemiDoc XRS, Biorad.

2.1.4 Διαλύματα αντιδραστηρίων

Τριχοστατίνη A: Η ένωση διαλύεται σε DMSO σε συγκέντρωση 4mM και φυλάσσεται σε μερίσματα (aliquots) στους -20°C. Πριν την επίδραση το διάλυμα υφίσταται αραιώσεις σε DMSO, ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκέντρωσης τέτοιας, ώστε 8μl να αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 25-500 nM όταν αραιωθούν σε 4 ml θρεπτικού υλικού και παράλληλα η ποσότητα DMSO να αντιστοιχεί στο 0.2% (v/v) (Invivogen)

Οξειδάση της Γλυκόζης (Aspergillus niger): Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ζυγίζουμε 1mg και διαλύουμε σε 10ml Sodium Acetate 50mM, pH 5.1. Το διάλυμα υφίσταται αραιώση 1/10 σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM, ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10pg/ml το οποίο και προστίθεται απευθείας στην κυτταροκαλλιέργεια σε ποσότητες που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 25-100 pg/ml (Sigma Aldrich).

Βαλπροϊκό οξύ: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ζυγίζουμε 0.1g σκόνης και διαλύουμε σε 2ml H₂O. Το προκύπτον διάλυμα 0.3M φιλτράρεται και προστίθεται απευθείας στο μέσο καλλιέργειας σε ποσότητες που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 1.5-7.5mM (Sigma Aldrich).

5'Αζα-δεοξυ-κυτιδίνη: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ζυγίζουμε 2mg και διαλύουμε σε 16,66 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το διάλυμα που προκύπτει (0.12mg/ml) υφίσταται αραιώση σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 4μg/ml και προστίθεται απευθείας στην κυτταροκαλλιέργεια σε ποσότητες που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ως και 4μM (Sigma Aldrich).

Μετα-αρσενικό Νάτριο (NaAsO₂): Η ένωση διαλύεται σε dH₂O σε συγκέντρωση 4mM. Το διάλυμα αποστειρώνεται με διήθηση και κατάλληλες ποσότητες προστίθενται απευθείας στο μέσο καλλιέργειας για να προκύψουν συγκεντρώσεις ως 100μM.

Ετοποσίδιο: Η ένωση είναι σε υγρή μορφή συγκέντρωσης 20mg/ml και αραιώνεται 1:10 σε DMSO. Το διάλυμα προστίθεται απευθείας στο θρεπτικό υλικό σε συγκεντρώσεις 0.5-20μM (Pharmachemie).

2.1.5 *Υλικά καλλιέργειας βακτηρίων*

α. *Θρεπτικά υλικά*

Για την καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων σε υγρή φάση χρησιμοποιείται το πλήρες θρεπτικό υλικό LB (Luria ή Lenox Broth) [1% (w/v) θρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης 1% (w/v) NaCl]. Το θρεπτικό υλικό πριν την χρήση του αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (AES, Rayra, R.Espinar S.L.) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1 bar. Για την ανάπτυξη βακτηρίων σε στερεή φάση, στο ανωτέρω θρεπτικό υλικό προστίθεται επιπλέον 1.5% (w/v) άγαρ, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και αφήνεται να μειωθεί η θερμοκρασία του σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό LB/άγαρ διαμοιράζεται σε τρυβλία τύπου Petri.

β. *Αντιβιοτικά*

Στην παρούσα μελέτη, σε όλες τις βακτηριακές καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Sigma Aldrich Fine Chemicals) σε συγκέντρωση 100 μg/ml.

2.1.6 *Υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων*

α. *Θρεπτικά υλικά*

Για την ανάπτυξη κυττάρων HeLa, H1299 και A549 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (BioChrom) στο οποίο προστέθηκαν επιπλέον 2 mM γλουταμίνης καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PAA) (συγκέντρωσης 100x) για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων. Πριν τη χρήση του το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με 10% v/v ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS) που περιέχει απαραίτητους για την καλλιέργεια αναπτυξιακούς παράγοντες.

Για την ανάπτυξη των λεμφοκυτταρικών σειρών Jurkat και HUT-78 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 με L-γλουταμίνη στο οποίο προστέθηκαν επιπλέον 2 mM γλουταμίνης, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (συγκέντρωσης 100x) και 10% v/v ορός έμβριου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS).

β. Διάλυμα έκπλυσης

Για τις εκπλύσεις κυττάρων χρησιμοποιείται αποστειρωμένο ρυθμιστικό (pH=7.3) διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1xPBS (139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM Na₂HPO₄, 0.44mM KH₂PO₄, 4.16mM NaHCO₃) ελλειμματικού σε ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺.

γ. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, μέχρι την πλήρωση του χώρου ανάπτυξης, κάνει αναγκαία την επανακαλλιέργειά τους που πραγματοποιείται με την χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (PAA) συγκέντρωσης 0.01%/0.05% (w/v), αντίστοιχα.

2.2 Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA

2.2.1 Βακτηριακά στελέχη

Η ανάπτυξη των πλασμιδιακών φορέων έγινε σε χαρακτηρισμένα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*, MC1061 και στα εμπορικά διαθέσιμα GM40 (Dam⁻) και MachT1[®].

2.2.2 Βακτηριακός μετασχηματισμός

Προκειμένου να εισαχθεί πλασμιδιακό DNA σε βακτηριακά κύτταρα, αρχικά αυτά καθίστανται επιδεκτικά μετασχηματισμού μέσω κατεργασίας με διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου και σε επόμενο στάδιο ακολουθεί βακτηριακός μετασχηματισμός, σύμφωνα με τα παρακάτω στάδια.

α. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών μετασχηματισμού MC1061

Για να καταστούν δεκτικά μετασχηματισμού, βακτηριακά κύτταρα MC1061 που φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C), εμβολιάζονται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού LB σε φυγοκεντρικό σωλήνα Universal υπό στείρες συνθήκες (λύχνος Bunsen) και καλλιεργούνται ολονύκτια σε τροχιακό επωαστήριο, στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm). Την επομένη, 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας στατικής φάσης, αραιώνεται 1:100 και επωάζεται εκ νέου στους 37°C μέχρι να φτάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης ($OD_{590nm}=0.4$). Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυστυρενίου και ακολουθεί επώαση 10 λεπτών στον πάγο και φυγοκέντρωση 10 λεπτών, στις 2000xg σε επιτραπέζια φυγόκεντρο που βρίσκεται σε ψυχρό θάλαμο (4°C). Αποχύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί έκπλυση του ιζήματος με 2 ml παγωμένου διαλύματος $CaCl_2$ (60mM $CaCl_2$, 15% v/v γλυκερόλη, 10mM PIPES, pH7.0) για την διάνοιξη πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1100xg για 8 λεπτά, επαναιώρηση σε 2 ml παγωμένου διαλύματος $CaCl_2$ και το προκύπτον εναιώρημα επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο, για τη διάνοιξη πόρων στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα. Μετά το πέρας της επώασης, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1100xg για 8 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται ήπια σε 1ml διαλύματος $CaCl_2$. Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα διαμοιράζεται σε μερίσματα των 100 μl που αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

β. Βακτηριακός μετασχηματισμός (εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα)

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός πραγματοποιείται σε επιδεκτικά κύτταρα μετασχηματισμού που προκύπτουν από το προηγούμενο στάδιο είτε σε εμπορικά διαθέσιμα κύτταρα. Αρχικά γίνεται ανάμειξη 100 μl εναιωρήματος βακτηρίων με 5 μl (~50 ng) από τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και τοποθέτηση του μείγματος στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 2 λεπτά στην περίπτωση των MC1061 ή για 45 δευτερόλεπτα στην περίπτωση των MachT1[®] και επανατοποθετείται στον πάγο. Σε επόμενο στάδιο προστίθεται 1 ml LB στα MC1061 ή 250μl SOC Medium στα MachT1[®] και το τελικό μείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 60 λεπτά. Με το πέρας των 60 λεπτών τα βακτήρια επιστρώνονται σε διαφορετικές ποσότητες με κεκλιμένη πιπέτα Pasteur σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ (LB + 1,5% άγαρ) που,

επιπλέον, περιέχει 100 µg/ml αμπικιλίνη. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες, παρουσία λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία επωάζονται ολονύκτια στους 37°C.

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

α. Μέσω λυσοζύμης και βρασμού

Για την ταχεία ανάλυση πλασμιδιακού DNA ανθεκτικών, αντιβιοτικά επιλεγμένων βακτηριακών κλώνων, χρησιμοποιείται η μέθοδος απομόνωσης DNA με λυσοζύμη και βρασμό. Συγκεκριμένα, μονήρεις βακτηριακοί κλώνοι μεταφέρονται, υπό ασηπτικές συνθήκες (λύχνος Bunsen) σε ξεχωριστούς πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες χωρητικότητας 15 ml, που περιέχουν 3 ml θρεπτικού υλικού LB και 100 µg/ml αμπικιλίνη. Η υγρή καλλιέργεια αναπτύσσεται ολονύκτια σε τροχιακό επωαστήρα, στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm). Την επομένη 1.5 ml καλλιέργειας μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1.5 ml, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε μικροφυγόκεντρο στις 13000×g, σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο αποχύνεται. Ακολουθεί προσεκτική επαναιώρηση του ίζηματος σε 70 µl διαλύματος STET (8% w/v σακχαρόζη, 5% v/v Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8.0 και 50 mM Tris-HCl pH 8.0), προσθήκη 25 µl από διάλυμα 10 mg/ml λυσοζύμης και το προκύπτον εναιώρημα επωάζεται για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση στους 100°C για 45'' (όπου και λαμβάνει χώρα η πλήρης λύση των βακτηριακών τοιχωμάτων) και με το πέρας του χρόνου αυτού, το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 13000xg σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και προστίθενται 100 µl ισοπροπανόλης. Έπειτα από ανάδευση με χρήση Vortex, ψύχεται στους -70°C για 15 λεπτά για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Αμέσως μετά φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13000×g, σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για 15 λεπτά και τελικώς επαναιωρείται σε 20 µl διαλύματος T.E. (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Το προκύπτον DNA μπορεί να αποθηκευθεί και να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για περιοριστική ενζυμική ανάλυση ή PCR. Η μέση απόδοση της μεθόδου είναι 0,5-1,5 µg πλασμιδιακού DNA για κάθε ml βακτηριακής καλλιέργειας.

β. Μέσω στηλών

Η απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* της Macherey-Nagel. Αρχικά φυγοκεντρώνται 4 ml ολονύκτιας βακτηριακής καλλιέργειας στα $11.000\times g$ για 30 δευτερόλεπτα. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος A1. Ακολουθεί προσθήκη 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος A2 και ήπια ανάδευση. Το μείγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα $11.000\times g$ για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο συλλέγεται, μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα $11.000\times g$. Το υποκείμενο της στήλης διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος A4. Έπεται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα $11.000\times g$, απόρριψη του διαλύματος και επαναφυγοκέντρωση της στήλης για 2 λεπτά (χωρίς προσθήκη διαλύματος). Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με προσθήκη 50 μl ρυθμιστικού AE στο κέντρο της στήλης. Επωάζεται 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα $11.000\times g$ και φυλάσσεται στους -20°C .

2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας σε ποσότητες ~250 μg. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών της Macherey-Nagel, *NucleoBond® Xtra Midi Preparation Kit*.

Αρχικά, όγκος 50μl βακτηριακής καλλιέργειας που έχει αναπτυχθεί ολονύκτια, εμβολιάζεται σε 3ml θρεπτικού υλικού LB που περιέχει και 100μg/ml αμπικιλίνη και αφήνεται 24 ώρες για ανάπτυξη. Όγκος LB 300ml με 100μg/ml αμπικιλίνη εμβολιάζεται με 2ml της προηγούμενης καλλιέργειας και ακολουθεί ολονύκτια ανάπτυξη. Την επομένη, απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για να καθαριστεί περαιτέρω, το πλασμιδιακό DNA έπειτα από την κατακρήμνισή του επαναιωρείται σε 300μl διαλύματος TE 1x (pH 8.0) και έπειτα προστίθενται 18μl διαλύματος 5M NaCl και 640μl αιθανόλης. Ακολουθεί ανάδευση με Vortex και ολονύκτια επώαση στους -20°C . Την επομένη, φυγοκεντρείται στις $13.000\times g$ για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο ίζημα προστίθενται 800μl παγωμένης αιθανόλης 70% v/v. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις

ίδιες συνθήκες με παραπάνω και το ίζημα ξηραίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής για 20 λεπτά. Τέλος, επαναδιαλύεται σε όγκο 200μl διαλύματος TE 1x (pH 8.0).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 260nm σε φωτόμετρο GeneQuant και με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$1 \text{ μονάδα οπτικής πυκνότητας} = 50\mu\text{g DNA}$$

Ακολουθεί περιοριστική ενζυμική ανάλυση, για έλεγχο της ορθότητας της αναμενόμενης πλασμιδιακής κατασκευής και το DNA αποθηκεύεται σε κατάψυξη (-20°C) μέχρι τη χρήση του.

2.2.5 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία απλή και δυναμική μέθοδο για ανάλυση, διαχωρισμό και απομόνωση μορίων DNA βάσει του μοριακού μεγέθους τους. Στηρίζεται στην μετακίνηση του ηλεκτραρνητικού μορίου του DNA σε ημιστερεό μέσο πολυμερούς πηκτής αγαρόζης με την χρήση ηλεκτρικού πεδίου.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 0.7% και 1.2% (w/v) με προσθήκη 0.4 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα αγαρόζης. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα και να καθιστά δυνατή την παρατήρησή τους σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Ως φορέας ηλεκτρονίων για την δημιουργία τάσης και διαλύτης για την αγαρόζη, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα TBE σύστασης 89 mM σε Tris, 89 mM σε βορικό οξύ και 2 mM σε EDTA(pH 8). Ως δείκτης μοριακών μεγεθών χρησιμοποιείται pBR322/HinI (πλήρης πέψη του DNA του πλασμιδίου pBR322 με περιοριστική ενδονουκλεάση HinI – 0.5μg/μl) ή λ/EcoRI (πλήρης πέψη DNA λ-φάγου με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI – 0.5μg/μl). Το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων αποτελείται από τις χρωστικές ουσίες βρωμοφαινόλη (0.4% w/v), κυανούν ξυλόλης (0.4% w/v) καθώς και φικόλη (25% w/v) και προστίθεται σε συγκέντρωση 10x (συνήθως 2 μl σε 18 μl δείγματος). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τάση 40V και μετά το πέρας της διαδικασίας η πηκτική αγαρόζης εκτίθεται σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) και φωτογραφίζεται.

2.2.6 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση DNA γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *MinElute Gel Extraction Kit* της εταιρείας *QIAGEN*. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η ζώνη ενδιαφέροντος αποκόπτεται από την πηκτή, ζυγίζεται και 3 μέρη ρυθμιστικού διαλύματος QG προστίθενται σε 1 μέρος πηκτής. Το μείγμα επωάζεται στους 50°C για 10 λεπτά ώστε το κομμάτι πηκτής να διαλυθεί πλήρως. Στη συνέχεια, ένα μέρος ισοπροπανόλης προστίθεται σε ένα μέρος πηκτής και ύστερα από ανάδευση το μείγμα φορτώνεται σε στήλη MinElute. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13,000×g για 1 λεπτό, το υποκείμενο της στήλης διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 500μl ρυθμιστικού διαλύματος QG. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13,000×g για 1 λεπτό, το υποκείμενο της στήλης διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 750μl ρυθμιστικού διαλύματος PE. Έπειτα από χρόνο 2-5 λεπτών, ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 λεπτού στα 13,000×g και απόρριψη του υποκειμένου της στήλης διαλύματος. Το DNA εκλύεται με προσθήκη 20μl TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) και μετά από επώαση 1 λεπτού, φυγοκέντρηση στα 13,000×g. Εν τέλει, 1 και 4 μl απομονωθέντος DNA ποσοτικοποιούνται μέσω ηλεκτροφόρησης, παράλληλα με δείγματα που περιέχουν γνωστή ποσότητα DNA.

2.2.7 Καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα

Ο καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα, έπειτα από πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση ή αποφοσφορυλίωση, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του QIAquick PCR Purification Kit (*QIAGEN*) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για το τελικό στάδιο έκλυσης DNA ακολουθήθηκε ίδια διαδικασία με αυτή της ενότητας 2.2.6.

2.2.8 Κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA – Κλωνοποίηση

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, κατασκευάστηκε μια σειρά ανασυνδυασμένων μορίων DNA, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της γενετικής μηχανικής και την τεχνική της κλωνοποίησης. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου

DNA περιλαμβάνει μία σειρά από τεχνικές που οδηγούν στην ελεγχόμενη κατασκευή νέων μορίων DNA μέσω της χρήσης περιοριστικών ενδονουκλεασών, αλκαλικής φωσφατάσης και της DNA λιγάσης σύμφωνα με τις ακόλουθες διαδικασίες:

α. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η διαδικασία χρησιμοποιείται για την επιλεκτική αποκοπή τμημάτων DNA ώστε αυτά να χρησιμοποιηθούν είτε για την κατασκευή ανασυνδυασμένων DNA, μέσω αντίδρασης σύνδεσης λιγάσης ή να γίνει περιοριστική ανάλυση σε βακτηριακούς κλώνους που φέρουν ανασυνδυασμένα DNA. Μία τυπική αντίδραση πέψης είναι η εξής (Πίνακας 2.1):

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	όγκος που αντιστοιχεί σε 1μg
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
10 mg/ml (100X) Αλβουμίνη Ορού Βοός (BSA) (όπου απαιτείται)	0.5μl
Περιοριστικό ένζυμο	10U
ddH ₂ O	ως τα 50μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Πίνακας 2.1

Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα BclI και NotI από τη New England Biolabs, το BamHI από τη Fermentas και το EcoRI από την Invitrogen. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται ολονύκτια σε υδατόλουτρο ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία κάθε ενζύμου. Τα προϊόντα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης. Τα προς κλωνοποίηση τμήματα DNA, του φορέα και του προς κλωνοποίηση ενθέματος, απομονώνονται είτε από πηκτή αγαρόζης (2.2.6) είτε από διάλυμα (2.2.7). Αν κριθεί απαραίτητο, προηγείται αντίδραση αποφωσφορυλίωσης.

β. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

Η αποφωσφορυλίωση των άκρων με τη χρήση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση εντέρου μόσχου (Calf Intestine Alkaline Phosphatase – CIAP) πραγματοποιείται στα μόρια DNA του πλασμιδιακού φορέα αν έχει υποστεί πέψη με ένα ή με ένζυμα που δίνουν ίδια μονόκλιωνα άκρα, ώστε να αποφευχθεί η περίπτωση

να επανενωθούν μόρια φορέα με τον εαυτό τους κατά την αντίδραση λιγάσης με το ένθεμα. Προστίθενται 0,5U ενζύμου ανα 1μg DNA, το δείγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση τερματίζεται με άμεσο καθαρισμό του προϊόντος όπως στην *Ενότητα 2.2.7*.

γ. Αντίδραση συνένωσης με DNA λιγάση

Η αντίδραση συνένωσης συμβαίνει ανάμεσα σε γραμμικά μόρια DNA του προς κλωνοποίηση ενθέματος με μόρια του επιθυμητού φορέα. Η αναλογία ανάμεσα στα μόρια του ενθέματος και του φορέα για την αντίδραση καθορίζεται από τη σχέση:

$$\text{Αναλογία άκρων ενθέματος/φορέα} = \frac{\text{ποσότητα ενθέματος (ng) x μέγεθος φορέα (bp)}}{\text{ποσότητα φορέα (ng) x μέγεθος ενθέματος (bp)}}$$

Για την εύρεση της ποσότητας ενθέματος από την παραπάνω σχέση, χρησιμοποιήθηκε ως ποσότητα αναφοράς τα 50 ng φορέα. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον τελικό όγκο των 10 μl (Πίνακας 2.2) και ακολουθεί επώαση στους 14°C για 4 τουλάχιστον ώρες (κατά προτίμηση ολονύκτια).

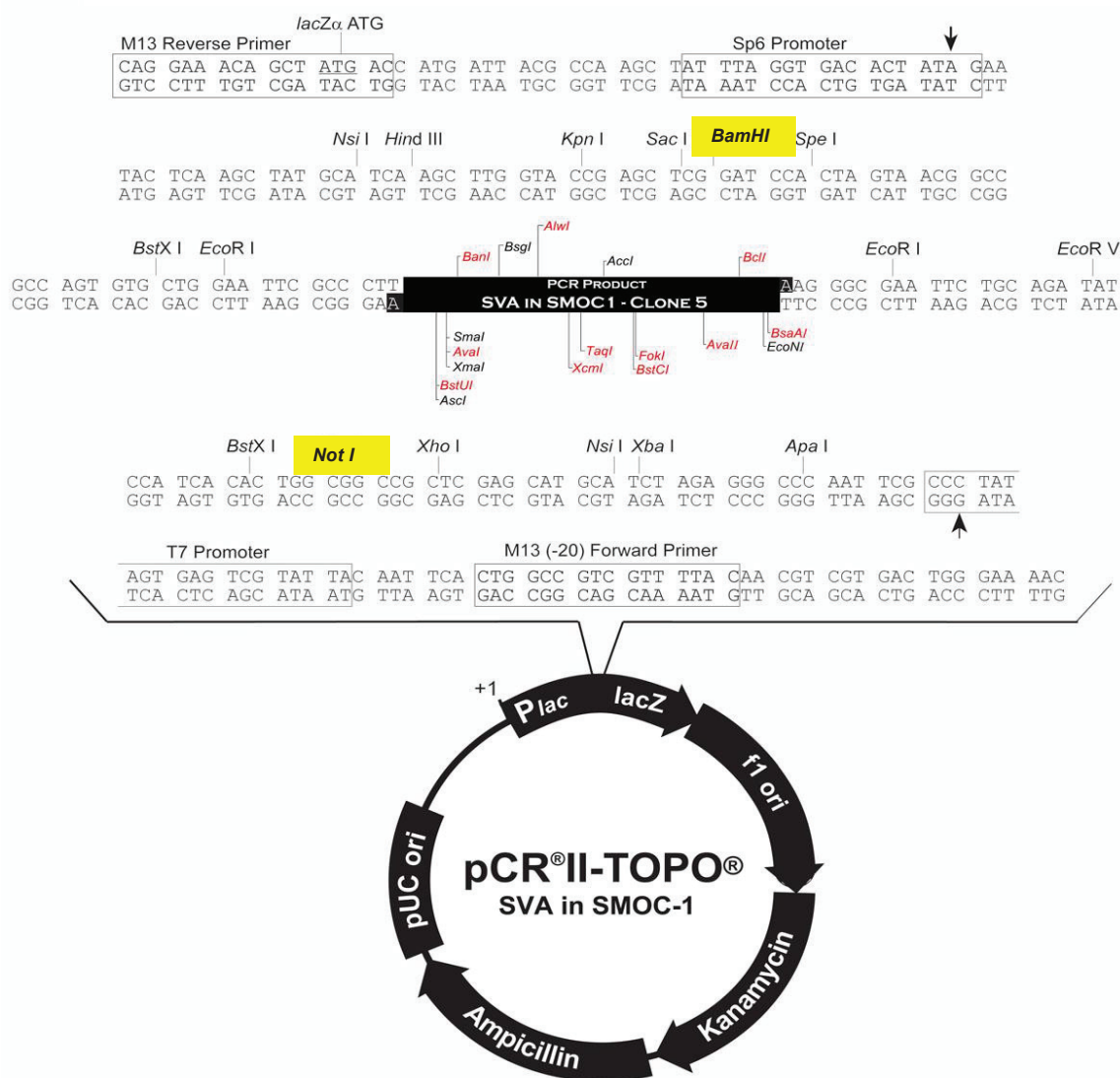
Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Τμήμα DNA ή προϊόν PCR	y μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1μl
T ₄ DNA λιγάση (Fermentas)	1μl
ddH ₂ O	ως τα 10μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl

Πίνακας 2.2

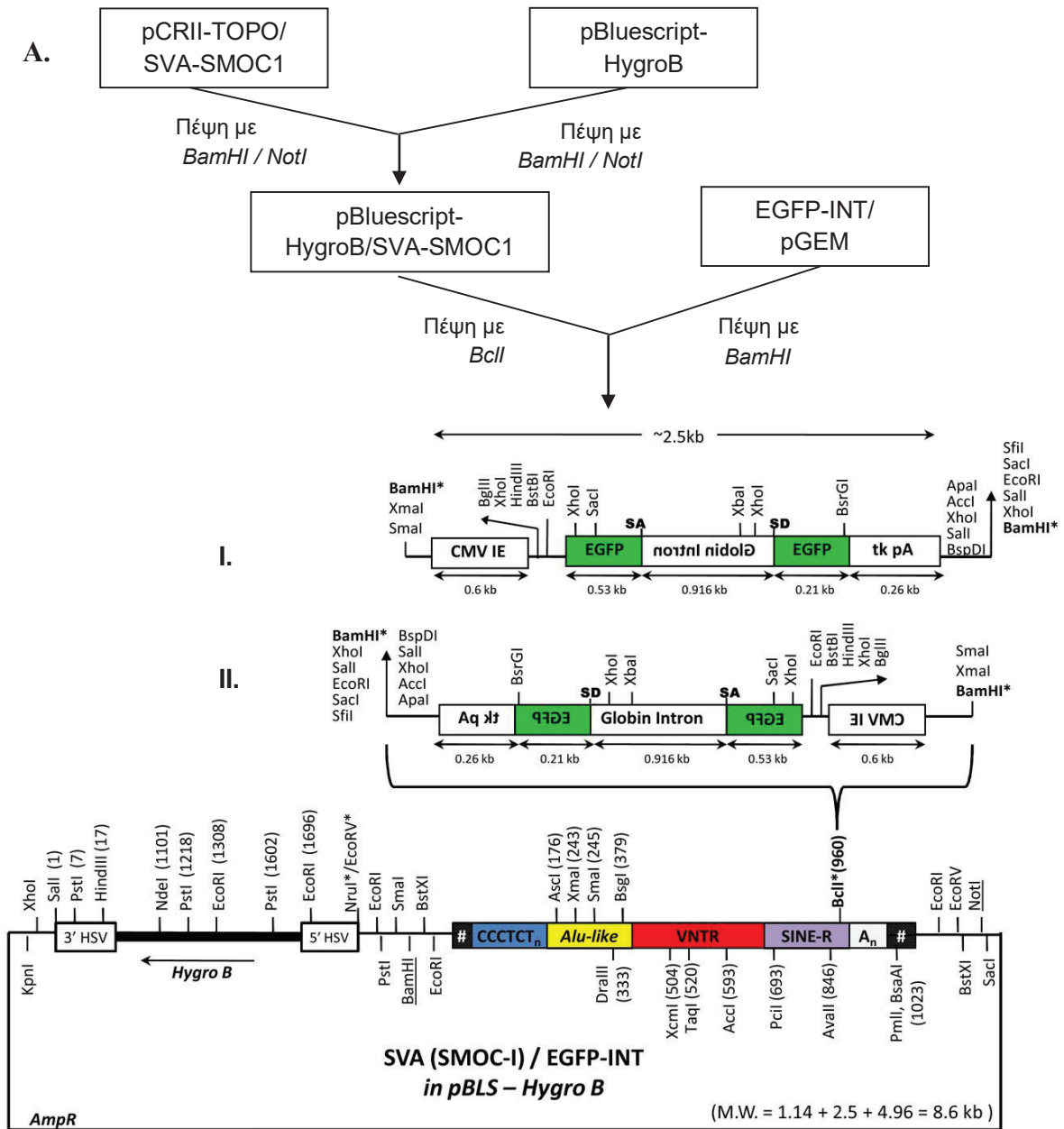
Η διαδικασία της κλωνοποίησης ολοκληρώνεται με βακτηριακό μετασχηματισμό με τα προϊόντα της αντίδρασης συνένωσης και απομόνωση ανθεκτικών κλώνων έπειτα από αντιβιοτική επιλογή. Η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχεται έπειτα από απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (2.2.3) και περιοριστική του ανάλυση με τα κατάλληλα ένζυμα. Τελικό στάδιο της διαδικασίας είναι η αποθήκευση των έγκυρων κλώνων για την πλασμιδιακή κατασκευή και παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (2.2.4).

2.2.9 Κατασκευή του πλασμιδίου pBluescript-HygroB/SVA_{SMOC1-L}/EGFP-INT

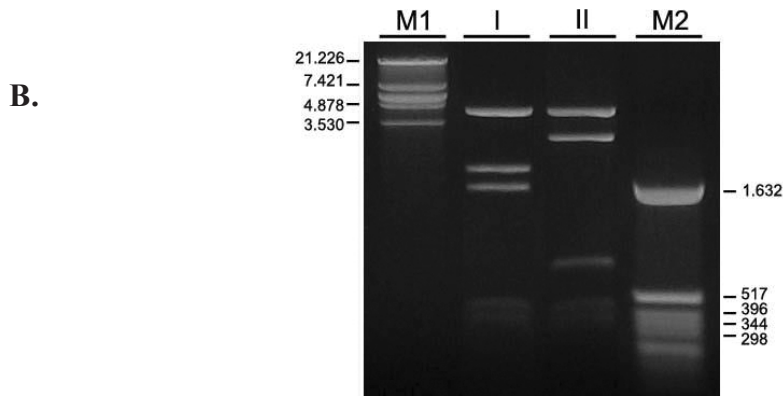
Για την κατασκευή του πλασμιδίου pBluescript-HygroB/SVA_{SMOC1-L}/EGFP-INT χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια SVA-SMOC1/pCRII-TOPO, pBluescript-HygroB και EGFP-INT/pGEM. Αναλυτικότερα, η στρατηγική που τέθηκε ήταν η ακόλουθη: αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Not*II με τα οποία και πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη στο pCRII-TOPO/SVA-SMOC1 που έφερε κλωνοποιημένο το SVA του ενδιαφέροντός μας (Εικ.2.1). Καθώς οι περιοριστικές θέσεις αυτών ήταν μοναδικές στο ανωτέρω πλασμίδιο, η ζώνη μοριακού μήκους 1.140bp που αντιστοιχεί στο SVA-SMOC1 διαχωρίστηκε και ανακτήθηκε από πηκτή αγαρόζης.



Εικόνα 2.1: Ο πλασμιδιακός φορέας PCR[®]II - TOPO[®] (Invitrogen) με κλωνοποιημένο το SVA_{SMOC1-L} στην περιοχή πολυσυνδέτη. Με κίτρινο χρώμα διαγραμμίζονται τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την αποκοπή του.



: ιντρονικές αλληλουχίες εκατέρωθεν του SVA στο SMOC1 (32bp ανοδικά, 56bp καθοδικά)



Εικόνα 2.2: Πλασμιδιακή κατασκευή *pBluescript-HygroB/SVA_{SMOC1-I}/EGFP-INT*. **A.** Σχηματική απεικόνιση των σταδίων κατασκευής του πλασμιδίου *pBluescript-HygroB/SVA_{SMOC1-I}/EGFP-INT* καθώς και του περιοριστικού χάρτη του τελικού

ανασυνδασμένου πλασμίδιου. Με *I* σημειώνεται η ορθή φορά της κασέτας ανίχνευσης ρετρομετάθεσης ενώ με *II* η αντίστροφη. **B.** Έλεγχος ορθότητας της τελικής κατασκευής μέσω πέψης με *EcoRI* και ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 0.9% w/v. *M1*: μάρτυρας μοριακών μεγεθών λDNA/*EcoRI* (Minotech), *M2*: μάρτυρας μοριακών μεγεθών pBR322/*HinfI*.

Η ζώνη αυτή υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pBluescript-HygroB – στο οποίο είχε προηγηθεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *NotI* – δημιουργώντας το πλασμίδιο pBluescript-HygroB/SVA-SMOC1. Στη συνέχεια, το πλασμίδιο EGFP-INT/pGEM πέφθηκε με το περιοριστικό ένζυμο *BamHI* και απομονώθηκε η κασέτα ανίχνευσης ρετρομετάθεσης EGFP που αντιστοιχεί σε ζώνη των 2.500bp. Το pBluescript-HygroB/SVA-SMOC1 υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *BclI* που δημιουργεί κολλώδη άκρα συμπληρωματικά με εκείνα του ενζύμου *BamHI* και σε αυτό υποκλωνοποιήθηκε η κασέτα EGFP, «τυφλώνοντας» τις δύο θέσεις περιορισμού. Τελικά, δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pBluescript-HygroB/SVA-SMOC1/EGFP-INT που έφερε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη δίνοντας δυνατότητα διαμόλυνσης και επιλογής σε ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOC-1} με κυτταρομετρία ροής.

Βακτηριακά κύτταρα MachT1[®] μετασχηματίστηκαν με την ανασυνδασμένη πλασμιδιακή κατασκευή pBLS-HygroB/SVA-SMOC1/EGFP-INT και ακολούθησε απομόνωση και ανάπτυξη βακτηριακών κλώνων ώστε να ελεγχθεί η φορά με την οποία είχε εισαχθεί η κασέτα EGFP στον πλασμιδιακό φορέα. Ο έλεγχος έγινε με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* σε πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από τους κλώνους. Η πέψη του πλασμίδιου με την τοποθετημένη σε ορθή φορά κασέτα θα έδινε τις ζώνες μοριακού βάρους 4.34, 2.9, 0.7, 0.39 και 0.324 kb (*Εικ. 2.2 Β διαδρομή I*), ενώ σε περίπτωση αντίθετης φοράς της κασέτας, οι αναμενόμενες ζώνες ήταν των 4.34, 1.6, 2.0, 0.39 και 0.324 kb (*Εικ. 2.2 Β διαδρομή II*).

2.3 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

Η *in vitro* κυτταρική καλλιέργεια επιτρέπει τη μελέτη των ιδιοτήτων των κυττάρων σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις φυσιολογικές εκείνων ενός οργανισμού. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται **α.** σε ειδικά κατεργασμένα πλαστικά

σκεύη, στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται σχηματίζοντας κυτταρικό ταπήτιο, όπου τα κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια αυτών και **β.** σε βακτηριακά τρυβλία στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται άνευ προσκόλλησης ή στην περίπτωση ελέγχου της ικανότητας ανάπτυξης των κυττάρων άνευ προσκόλλησης. Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO₂ Water-jacketed Incubator) σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% (v/v) CO₂ για τη διατήρηση σταθερού pH. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις, ο χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής (AURA 200 MAC, BioAir Instruments) και ο ειδικά διαμορφωμένος χώρος καλλιέργειας (Tissue Culture Room) αποστειρώνεται με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.3.1 *Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές*

A549: κυτταρική σειρά που προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα από το θεμελιώδες κυψελιδωτό επιθήλιο (human alveolar basal epithelial cells). Πρόκειται για κύτταρα πλακώδη, υποτριπλοειδή που αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα ως μονόστιβο επιθήλιο. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS.

HeLa: αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά από καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας. Προέρχονται από οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού από τον ιό παπλώματος 18 (HPV18). Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους είναι κατά μέσο όρο 82 και έχει βρεθεί ότι έχουν μειωμένη έκφραση της p53. Αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS.

H1299: αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά από καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Φέρουν μια ομόζυγη απαλοιφή σε ένα τμήμα του γονιδίου της p53 και συνεπώς δεν εκφράζουν λειτουργική p53. Αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS.

Jurkat: αθανатоποιημένη T-λεμφοκυτταρική σειρά με καρυότυπο 46 XY -2,-18,del(2) (p21p23),del(18) (p11.2) που αναπτύσσεται σε εναιώρημα άνευ

προσκόλλησης. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS.

Jurkat-Bcl-2: αθανатоποιημένη T-λεμφοκυτταρική σειρά με σταθερή έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (προσφορά του Δρ. Ε.Κωλέττα (237))

HUT-78: αθανатоποιημένη T-λεμφοκυτταρική σειρά από άνδρα με σύνδρομο Sezary. Αναπτύσσονται σε εναιώρημα άνευ προσκόλλησης και καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS που έχει αδρανοποιηθεί μέσω θέρμανσης για 30min στους 55°C.

2.3.2 Επανακαλλιέργεια κυττάρων

Για τη συντήρηση της κυτταροκαλλιέργειας, όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και καταλαμβάνουν πλήρως την επιφάνεια του δοχείου που αναπτύσσονται, γίνεται θρυψινοποίηση. Η διαδικασία για φλάσκα πολυστυρενίου των 75 cm² έχει ως εξής: Αρχικά γίνεται αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού με πιπέτα Pasteur και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS. Στη συνέχεια αφαιρείται το PBS και προστίθεται 1 ml από το διάλυμα θρυψίνης 1x. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 min στους 37°C και, με ελαφρά χτυπήματα, υποβοηθάται η αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα. Έπειτα προστίθεται θρεπτικό υλικό που αδρανοποιεί το ένζυμο και αποτελεί το μέσο επαναιώρησης των κυττάρων. Τα κύτταρα αραιώνονται κατά το επιθυμητό ποσοστό και η περίσσεια αφαιρείται ή μεταφέρεται σε άλλη φλάσκα ή τρυβλίο. Στη φλάσκα προστίθεται ποσότητα θρεπτικού ως και τελικό όγκο 10 ml και τα κύτταρα αφήνονται για ανάπτυξη στον κλίβανο στους 37°C.

Στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται άνευ προσκόλλησης, η αραιώση των κυττάρων σε περίπτωση που αυτά έχουν καταλάβει τον όγκο του δοχείου γίνεται μέσω αναρρόφησης της επιθυμητής ποσότητας με πλαστική πιπέτα. Ο όγκος που έχει αφαιρεθεί συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό ως τα 10ml.

2.3.3 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο αριθμός κυττάρων υπολογίζεται με μέτρηση 10μl θρυψινοποιημένου εναιωρήματος κυττάρων που τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο Neubauer και με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου, εφαρμογή του νόμου της αραιώσης:

$$\text{Κύτταρα} = \frac{N \times V}{10^{-4}} \quad \text{όπου :}$$

N, ο αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν.

V, ο συνολικός όγκος του δείγματος σε ml.

10^{-4} , ο όγκος σε ml που αντιστοιχεί σε 16 τετράγωνα.

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων βοηθά στην επιλογή του κατάλληλου αριθμού (ανάλογα με την ταχύτητα πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς) που πρέπει να καλλιεργείται για να επιτυγχάνεται ιδανική πληρότητα για την πραγματοποίηση πειραμάτων.

2.3.4 Αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μακροπρόθεσμη φύλαξη κυττάρων σε υγρό άζωτο (-196°C) ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: Κυτταρικά ταπήτια που βρίσκονται σε τουλάχιστον 80% πληρότητα, θρυψινοποιούνται (2.3.2), μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα (UNIVERSAL) και μετράται ο αριθμός τους. Στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται σε εναιώρημα, μεταφέρεται μια ποσότητα του θρεπτικού υλικού σε φυγοκεντρικό σωλήνα. Σε κάθε περίπτωση, 3×10^6 κύτταρα φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά σε 300xg και στο κυτταρικό ίζημα προστίθεται θρεπτικό υλικό κατάψυξης [90% (v/v) FCS, 10%(v/v) DMSO] που έχει αφεθεί στον πάγο για 10 λεπτά. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φιαλίδιο κατάψυξης (Cryovial, Falcon) και άμεσα σε βαθιά κατάψυξη -80°C . Έπειτα από ολονύκτια επώαση τα κύτταρα μεταφέρονται στο υγρό άζωτο. Για την ανάσυρση κυττάρων από το υγρό άζωτο, γίνεται άμεση μεταφορά τους σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι τήξεως του κυτταρικού εναιωρήματος και εισαγωγή σε φλάσκα 75 cm^2 , που περιέχει 10 ml θρεπτικού υλικού, για έναρξη της καλλιέργειας.

2.3.5 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (transfection)

α. Μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Η ηλεκτροδιάτρηση στηρίζεται στην εφαρμογή στιγμιαίας τάσης σε εναιώρημα κυττάρων και πλασμιδιακού DNA. Η τάση προκαλεί στιγμιαία διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και επιτρέπει τη βίαια εισαγωγή μορίων DNA στο κύτταρο. Η μέθοδος έχει ως εξής: $1,5 \times 10^6$ κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα Universal και φυγοκεντρώνται για 3 λεπτά στις 400xg, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επαναιώρηση σε 500 μl διαλύματος PBS και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε κυβέτα ηλεκτροδιάτρησης. Έπειτα, προστίθενται 10 μg πλασμιδιακού DNA και το εναιώρημα ομογενοποιείται με πιπέτα. Η κυβέτα εισάγεται σε συσκευή ηλεκτροδιάτρησης και η διαδικασία πραγματοποιείται ρυθμίζοντας τις παραμέτρους της συσκευής στις τιμές που αναγράφονται στον παρακάτω Πίνακα 2.3. Μετά το πέρας της ηλεκτροδιάτρησης, τα κύτταρα εισάγονται σε φλάσκα 75 cm² και καλλιεργούνται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.

Κυτταρική σειρά	Volt	Resistance	Capacity
HeLa	270	725	850
A549	270	None	950
H1299	270	None	950
Jurkat	270	None	950

Πίνακας 2.3

β. Μέσω λιπιδίων

Η διαμόλυνση έγινε με χρήση πολυαιθυλενιμιδίου (PEI). Το πολυμερές αυτό βρίσκεται στη μορφή σκόνης και διαλύεται σε H₂O σε συγκέντρωση 1mg/ml. Τα κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας θρυψινοποιούνται την προηγούμενη ώστε τη μέρα της διαμόλυνσης να πληρούν το 50-70% του ταπητίου. Πριν τη διαμόλυνση, όλα τα υλικά πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε αυτά τοποθετείται, ανάλογα με τη διάμετρο του τρυβλίου, η απαιτούμενη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού. Σε αποστειρωμένο Eppendorf τοποθετούνται 50μL DMEM χωρίς ορό – αντιβιοτικό μέσα στο οποίο διαλύονται 2-5μg από το επιθυμητό

DNA συν 8μg από το πολυμερές PEI. Το μείγμα επωάζεται για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε αυτό προστίθενται 450μL DMEM+10% FBS. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και το μείγμα μεταφέρεται στάγδην στο τρυβλίο με παράλληλη ανακίνησή του. Έπειτα από επώαση 2 ωρών, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS, τοποθετείται σε αυτά πλήρες θρεπτικό υλικό και επωάζονται τουλάχιστον 24 ώρες.

2.3.6 Μικροσκοπία φθορισμού

Η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης του ρετρομεταθετού στοιχείου SVA, βασίζεται στην έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP. Για να επιτευχθεί η ανίχνευση των θετικών EGFP-φθορίζόντων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροσκοπίας φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Τα προς εξέταση κύτταρα ενοφθαλμίζονται και αφήνονται προς ανάπτυξη σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες σε τρυβλίο διαμέτρου 6 cm. Την ημέρα της ανάλυσης τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 3 ml διαλύματος PBS και μονιμοποιούνται με 3 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης [3.8% (w/v) σε PBS] για χρονικό διάστημα 10 λεπτών, σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας του χρόνου, αναρροφάται το υλικό μονιμοποίησης και τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά σε 3 ml διαλύματος σβέσης (quenching) 50 mM NH₄Cl σε PBS σε θερμοκρασία δωματίου, (προκειμένου να απενεργοποιηθεί η παραφορμαλδεΐδη και να απομακρυνθεί η περίσσειά της από το κυτταρικό ταπήτιο). Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται με 3 ml διαλύματος PBS. Οι καλυπτρίδες, πάνω στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα, μεταφέρονται και, με τη χρήση διαλύματος επικάθησης 50% γλυκερόλης σε PBS, τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού με λάμπα υψηλής πίεσης και φίλτρο FITC (530 nm μέγιστο διέγερσης) και φωτογραφίζονται με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής σε μεγέθυνση 40x.

2.3.7 Εξέταση κυττάρων για ικανότητα σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης (anchorage-independent foci)

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της ικανότητας σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης και κατ' επέκταση την εξακρίβωση

κυτταρικού μετασχηματισμού σε κλώνους είχε ως εξής: ως αρχικό βήμα, ετοιμάστηκαν 50 ml διαλύματος 1.32% αγαρόζης σε dH₂O. Το διάλυμα αγαρόζης αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το ζεστό αποστειρωμένο διάλυμα αγαρόζης μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο των 40°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί (15-20 min). Ακολούθως, 50 ml φιλτραρισμένου θρεπτικού μέσου 2 X RPMI 1640 [1.04 g RPMI, 38.5 ml H₂O, 0.5 ml 10X L-glutamine, 0.5 ml 100X Pen/Strep, 25 μl 10mg/ml insulin, 0.5 μl 1μg/μl EGF, 10 ml FCS], εμπλουτισμένου με 20% FCS προθερμάνθηκε στους 40°C. Στην συνέχεια αναμίχθηκαν 30 ml διαλύματος 1.32% αγαρόζης με 30 ml θρεπτικού μέσου 2 X RPMI 1640, εμπλουτισμένου με 20% FCS. Το προκύπτον μείγμα συγκεντρώσεως 0.66% σε αγαρόζη, χρησιμοποιήθηκε ως βασική στοιβάδα αγαρόζης και 6-7 ml αυτού μεταφέρονται σε τρυβλία διαμέτρου 6cm. Το υπόλοιπο του μείγματος διατηρήθηκε στο υδατόλουτρο των 40°C.

Επόμενο βήμα αποτελεί η θρυψινοποίηση των προς εξέταση κυττάρων. Από κάθε εξεταστέα περίπτωση αναμείχθηκαν 400.000 κύτταρα (σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο 1X RPMI/10% FCS) με 0.66% διαλύματος αγαρόζης (σε dH₂O), σε ίσους όγκους (1/1 ή 1,5/1,5 ml). Τα κύτταρα στο προκύπτον 0.33% διάλυμα αγαρόζης, περιχύθηκαν στη βασική στοιβάδα αγαρόζης και αφέθηκαν να στερεοποιηθούν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε τάπερ μαζί με 2 ποτήρια ζέσεως αποστειρωμένου διαλύματος PBS, ώστε να αποφευχθεί η εκτεταμένη εξάτμιση του θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκαν στον κλίβανο ανάπτυξης για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Οι καλλιέργειες των κυττάρων ανατροφοδοτήθηκαν ανά 3-4 ημέρες με 200μl κανονικού 1 X RPMI/10% FCS. Οι καλλιέργειες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο για πιθανή δημιουργία εστιών και το προκύπτον αποτέλεσμα φωτογραφήθηκε με την βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) σε μεγέθυνση 20X και 40X.

2.3.8 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCA DP-XCelligence

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (CIM-PLATES), τα οποία χωρίζονται σε 2 υποθαλάμους. Στον πυθμένα του επάνω υποθαλάμου βρίσκεται μεμβράνη PET (polyethyleneterephthalate) με μικροπόρους, η οποία φέρει ενσωματωμένα μικροηλεκτρόδια κάτωθεν. Όσα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να

μεταναστεύσουν διαπερνούν τους μικροπόρους της μεμβράνης και προσκολλώνται στην κάτω επιφάνειά της αυξάνοντας την ηλεκτρονική αντίσταση στους αισθητήρες των μικροηλεκτροδίων. Μέσω των ηλεκτροδίων το μηχάνημα καταγράφει ανά χρονική στιγμή την κατάσταση των κυττάρων.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Αρχικά προστέθηκαν 160μl θρεπτικού υλικού με ορό στον κάτω υποθάλαμο του CIM plate. Στη συνέχεια, αφού τοποθετήθηκε ο επάνω υποθάλαμος, προστέθηκαν 35μl θρεπτικού υλικού χωρίς ορό, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της μεμβράνης. Το CIM plate αφέθηκε για μια ώρα στον κλίβανο επώασης και ακολούθως τοποθετήθηκε στο μηχάνημα ώστε να μηδενιστεί ο θόρυβος (background). Επόμενο βήμα αποτέλεσε η προετοιμασία των κυττάρων. Κατόπιν θρυψινοποίησης, προστέθηκαν 5000 κύτταρα/100 μl σε κάθε well plate και αφέθηκαν να κολλήσουν για 30 λεπτά.

Τέλος, μετά το πέρας των 30 λεπτών, αρχίζει η μέτρηση του μεταστατικού δυναμικού, αφού τοποθετήθηκε το CIM plate στο μηχάνημα, που βρίσκεται στον επωαστικό κλίβανο.

2.4 Ανάλυση DNA

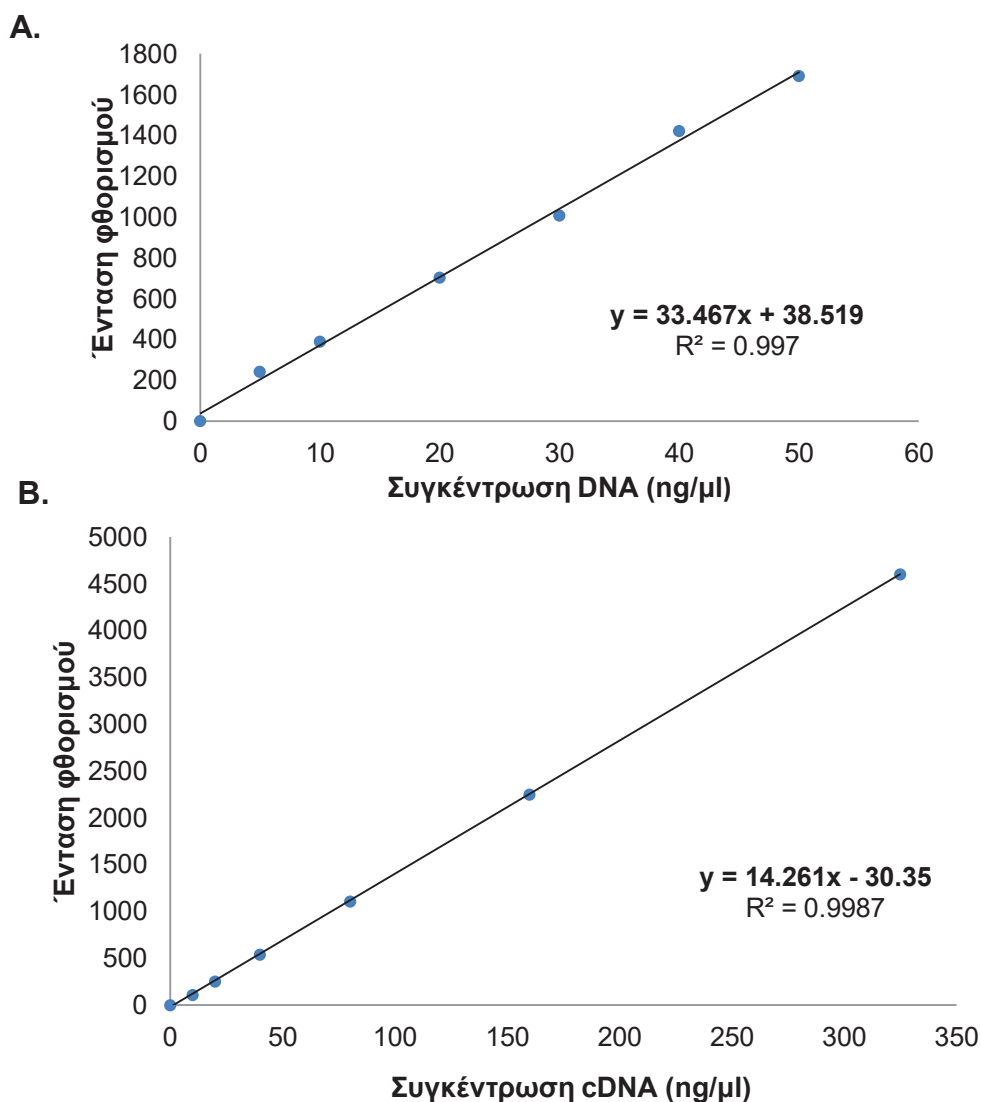
2.4.1 Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA για ανάλυση PCR

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA έχει ως εξής: Κύτταρα, που πρόκειται να αναλυθούν με PCR μετρώνται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και 1.5×10^6 κύτταρα, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το θρεπτικό υλικό αναρροφάται και το ίζημα επαναιωρείται σε 4 ml PBS. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml PBS, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα Eppendorf και φυγοκεντρείται σε 1500xg για 3 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης [10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (v/v) ζελατίνη] και φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ήπια επαναιώρηση σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης [10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (v/v) ζελατίνη, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.45% (v/v) Nonidet P-40,

0.45% (v/v) Tween-20]. Το κυτταρικό εναιώρημα θερμαίνεται στους 80° C για 10 λεπτά και ακολούθως αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται πρωτεΐνάση K, σε τελική συγκέντρωση 0.4 μg/μl, και ακολουθεί ολονύχτια επώαση του δείγματος στους 55°C. Μετά την επώαση, το δείγμα θερμαίνεται για 15 λεπτά στους 95°C, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K και ακολούθως αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1600xg για 3 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Το κυτταρικό εκχύλισμα DNA διατηρείται στους 4°C, έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.4.2 Ποσοτικοποίηση DNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης DNA των εκχυλισμάτων DNA και των cDNA πραγματοποιήθηκε μέσω χρώσης με την φθορισμογόνο ουσία Hoechst 33258 η οποία προσδένεται ειδικά στο DNA σε διμερή αδερίνης-θυμίνης. Η ουσία διεγείρεται στα 356 nm και το φάσμα εκπομπής της παρουσιάζει μέγιστο στα 455-461 nm. Χρησιμοποιήθηκε, δε, για την ποσοτικοποίηση DNA μέσω φθορισμομετρίας σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο. Στην περίπτωση εκχυλίσματος DNA, που έχει κατά κανόνα υψηλή συγκέντρωση (10-320 ng/μl), 3 μl εκχυλίσματος αραιώνονται σε 1497 μl PBS και το προκύπτον διάλυμα αραιώνεται με ίσο όγκο διαλύματος 2x Hoechst (1μg/ml Hoechst 33258 σε PBS), ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 μg/ml. Στην περίπτωση cDNA (που συνήθως έχει χαμηλή συγκέντρωση 5-50 ng/μl), ακολουθείται αντίστοιχη διαδικασία, όπου 3 μl cDNA αραιώνονται σε 72 μl PBS και προστίθενται 75 μl 2x Hoechst. Ακολουθεί φθορισμομετρική ανάλυση σε φασματοφωτόμετρο (F-2500 Fluorescence Spectrophotometer), όπου τα δείγματα διεγείρονται με ακτινοβολία μήκους κύματος 356 nm και λαμβάνεται φάσμα εκπομπής στα 452-462 nm. Από την κεντρική τιμή υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA (σε ng/μl) μέσω εισαγωγής στις παρακάτω καμπύλες αναφοράς, που γίνονται μέσω υπολογισμού απορρόφησης για γνωστές συγκεντρώσεις DNA (Εικ. 2.3).



Εικόνα 2.3: Πρότυπες καμπύλες για τον φθορισμομετρικό υπολογισμό συγκέντρωσης: **A.** DNA και **B.** cDNA

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) αποτελεί μία δυναμική μέθοδο για την εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η ενίσχυση αυτή επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών κύκλων *in vitro* διπλασιασμού με τη βοήθεια μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, καθώς και δύο αντιπαράλληλων εκκινήτων (primers) που οριοθετούν την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Οι πριμοδοτικές αλληλουχίες είναι μεγέθους 18-25 nt, συμπληρωματικές με τα αντιπαράλληλα 3' άκρα της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Στον Πίνακα 2.4 περιλαμβάνονται όλα τα ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, η αλληλουχία τους καθώς και το θερμικό

προφίλ των αντιδράσεων. Σε κάθε αντίδραση PCR προηγείται ένα αρχικό στάδιο στους 94°C για 4 λεπτά κατά το οποίο συμβαίνει η αποδιάταξη του DNA και μετά το εκάστοτε θερμικό προφίλ ακολουθεί και ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για 10 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA πολυμεράση που έχει ως βέλτιστη θερμοκρασία δραστηριότητας πολυμερισμού τους 72°C και αποδοτικότητα σύνθεσης 1000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Θερμικό προφίλ	Κύκλοι
SVA Hexam U (P1)	5'- CCT CTC CCT CAC CCT CTC CCC-3'	94°C - 30sec 67°C - 30 sec 72°C - 2min	30x
SVA Junction L (P4)	5'- AAA CAA GTG AAC AAA GGT CTC TGG T -3'		
SVA Junction L' (P3)	5'- GAT AAA CAA GTG AAC AAA GGT CTCTG-3'		
SINE-R U (P2)	5'- CCA ACC CCG TGC TCT CTG AA -3'	94°C - 30sec 59°C - 30 sec 72°C - 2min	27x
SINE-R L (P5)	5'- TTG TGG GGA GAG GGT CAG CA -3'		
SMOC-1 606U (U _{Rem})	5'-GTG ACT TGC CTG GAC TCT TG-3'	94°C - 30sec 58°C - 30 sec 72°C - 2min	30x
SMOC-1 880 L (L _{Rem})	5'-CTG ATT CTG TGG GCT GAT GG-3'		
SMOC-1 711 U (U _{Prox})	5'-GCC CTG AGA CCA CCC TTT A -3'	94°C - 30sec 60°C - 30 sec 72°C - 2min	29x
SMOC-1 764 L (L _{Prox})	5'-TAG GGG ACT TCG GTT CTG C- 3'		
GAPDH-U	5'-AAG AAG ATG CGG CTG ACT GTC GAG CCA CAT-3'	94°C - 30sec 57°C - 30 sec 72°C - 2min	30x
GAPDH-L	5'-TCT CAT GGT TCA CAC CCA TGA CGA ACA TG-3'		
EGFP-U	5'-GCA CCA TCT TCT TCA AGG ACG GAC-3'	94°C - 30sec 61°C - 30 sec 72°C - 2min	34x
EGFP-L	5' – TCT TTG CTC AGG GCG GAC TG – 3'		
SOX 2-F	5' – ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC – 3'	94°C - 30sec 58°C - 30 sec 72°C - 2min	28x
SOX 2-R	5' – GTGGATGGGATTGGTGTTC – 3'		
OCT 4-F	5' – GAGAATTTGTTCTGCAGTGC – 3'	94°C - 30sec 57°C - 30 sec 72°C - 2min	28x
OCT 4-R	5' – GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG – 3'		

Πίνακας 2.4

Για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης PCR, σε ειδικά μικροσωληνάρια όγκου 500 μl προστίθενται τα αντιδραστήρια που παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 2.5:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
DNA ή cDNA	x μ l
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5 μ l
50mM MgCl ₂	1.5 μ l
Εμπρόσθιος εκκινητής 0.5 μ g/ μ l	1 μ l
Ανάστροφος εκκινητής 0.5 μ g/ μ l	1 μ l
10mM dNTPs	1 μ l
5U/ μ l Taq DNA Πολυμεράση	0.5 μ l
ddH ₂ O	ως τα 50 μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Πίνακας 2.5

Μετά την προσθήκη των συστατικών, στα σωληνάρια προστίθενται επιπλέον τρεις σταγόνες παραφινέλαιου για την αποφυγή εξάτμισης κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή και θερμαίνονται για 15 λεπτά στους 94°C για την πλήρη αποδιάταξη των μορίων DNA. Κατόπιν, ακολουθεί η κύρια αντίδραση με θερμικό προφίλ που καθορίζεται κάθε φορά από το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιείται. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης και φωτογραφίζονται σε συσκευή UV.

2.4.4 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα ή μυελό ασθενούς προϋποθέτει επιστίβαξη των κυττάρων του αίματος που επιτυγχάνεται μέσω προσθήκης διαλύματος φικόλης με διαβάθμιση πυκνότητας. Η προσθήκη φικόλης σε αναλογία 1:1 με το δείγμα αίματος ή μυελού που ακολουθείται από φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 800 rpm, συντελεί στην κλασμάτωση των έμμορφων συστατικών του αίματος. Έτσι καθίσταται δυνατή η συλλογή της φάσης των εμπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων. Στα απομονωμένα λευκοκύτταρα προστίθεται PBS σε τελικό όγκο περίπου 4ml και έπεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 3000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1.5 ml PBS, μετράται ο αριθμός των κυττάρων (2.3.3) και ο όγκος που αντιστοιχεί σε 10⁷ κύτταρα (με αυτό τον αριθμό κυττάρων επιτυγχάνεται η μέγιστη δεσμευτική

ικανότητα της στήλης RN) φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα $8000\times g$ (όλες οι φυγοκεντρήσεις που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιούνται στα $8000\times g$). Αν πρόκειται για απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργεια, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται με τη διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω (ενότητα 2.3.2), μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα και μετρώνται σε πλάκα Newbauer. Από το σημείο αυτό ακολουθεί το πρωτόκολλο του *QIAamp RNA Blood Mini Kit* της *QIAGEN*. Γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος σε 600μl ρυθμιστικού διαλύματος RLT (στο RTL θα πρέπει να έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη κατά την αναλογία: 10μl β-ME ανά 1ml ρυθμιστικού RLT) για τη διάρρηξη των κυττάρων.

Το κυτταρικό ελαιώρημα μεταφέρεται σε στήλη *QIAshredder spin column* και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά. Η στήλη απορρίπτεται και στο εναπομένον διάλυμα προστίθενται 600μl 70% καθαρής αιθανόλης. Το διάλυμα μεταφέρεται στη στήλη *QIAamp spin column* η οποία έχει μέγιστο όγκο φόρτωσης 700μl. Η ποσότητα διαμοιράζεται και πραγματοποιούνται 2 φυγοκεντρήσεις διάρκειας 15 δευτερολέπτων έκαστη. Το υποκείμενο διάλυμα απορρίπτεται κάθε φορά. Έπειτα προστίθενται 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα, απόρριψη του RW1 και προσθήκη 500μl του ρυθμιστικού διαλύματος RPE. Έπεται φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα, απόρριψη του RPE και επαναπροσθήκη 500μl του ίδιου ρυθμιστικού. Η στήλη φυγοκεντρείται για 3 λεπτά, απορρίπτεται το RPE και επαναφυγοκεντρείται χωρίς προσθήκη διαλύματος για 1 λεπτό προς απομάκρυνση υπολειμμάτων. Η έκλυση του RNA πραγματοποιείται με προσθήκη 50 μl ddH₂O RNase free στη μεμβράνη της στήλης και φυγοκέντρωση 1 λεπτού.

Από το RNA που απομονώνεται, 15μl προστίθενται σε 985μl ddH₂O RNase free και φωτομετρούνται στα 260nm. Καθώς είναι γνωστό ότι 1 οπτική πυκνότητα (O.D.) αντιστοιχεί σε 40μg RNA υπολογίζεται η περιεκτικότητα RNA σε μg/μl.

2.4.5 Παρασκευή cDNA

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο **Hemavision RT** της *DNA Technology A/S*, η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προϋποθέτει την αραίωση 1μg RNA σε 10μl ddH₂O RNase free. Στον όγκο αυτό προστίθενται 4μl μίγματος εκκινητών (cDNA primer mix) και ακολουθεί επώαση τους 65°C για 5 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου

το δείγμα τοποθετείται στον πάγο και παρασκευάζεται το μίγμα σύνθεσης cDNA με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που φαίνονται στον Πίνακα 2.6:

Αριθμός αντιδράσεων	1	2	3	4	5	6
5x MMLV-RT buffer (μl)	5.5	11	16.5	22	27.5	33
100mM DTT (μl)	2.75	5.5	8.25	11	13.75	16.5
10mM dNTP Mix (μl)	2.75	5.5	8.25	11	13.75	16.5
MMLV-RT, 200U (μl)	1.1	2.2	3.3	4.4	5.5	6.6
Τελικός όγκος	<u>12.1</u>	<u>24.2</u>	<u>36.3</u>	<u>48.4</u>	<u>60.5</u>	<u>72.6</u>

Πίνακας 2.6

Από το μίγμα προστίθενται 11μl σε κάθε αντίδραση και έπεται επώαση στους 37° C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 25μl dH₂O για αραίωση του cDNA και τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 5 λεπτά για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

2.4.6 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας – Διαδικτυακές βάσεις δεδομένων

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δειγμάτων DNA έγινε από την εταιρεία *Macrogen*. Οι αλληλουχίες βάσεων του DNA που βρέθηκαν συγκρίθηκαν με καταχωρημένες αλληλουχίες σε γνωστές βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο (NCBI, Repbase και UCSC Genome Browser). Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool - NCBI) χρησιμοποιήθηκε για τη δυαδική στοίχιση των ακολουθιών ενώ η πολλαπλή στοίχιση έγινε με τον αλγόριθμο ClustalW2 (EBI). Χρησιμοποιήθηκε επίσης και το πρόγραμμα RepeatMasker το οποίο εξετάζει δοθείσες αλληλουχίες DNA για διάσπαρτες επαναλήψεις μέσω σύγκρισής τους με μια βάση δεδομένων επαναλαμβανόμενων ακολουθιών.

2.5 Ανάλυση πρωτεϊνών

2.5.1 Ανοσοαποτύπωση κατά *Western* (*Western blotting*)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών μέσω αντισωμάτων. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος μπορεί να ανιχνευτεί σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων, ιστών ή ανασυνδυασμένων *in vitro* πρωτεϊνών, δίνοντας πληροφορίες για το μέγεθος της πρωτεΐνης, εν συγκρίσει με ένα δείκτη μοριακών βαρών σε μονάδες μέτρησης kDa, και επίσης για τα επίπεδα έκφρασής της. Η ποιότητα των αντισωμάτων και ο βαθμός ειδικότητάς των ως προς την πρωτεΐνη που μελετάται είναι οι πλέον καθοριστικοί παράγοντες επιτυχίας της μεθόδου.

Η μέθοδος πραγματοποιείται ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφονται παρακάτω:

α. Παρασκευή εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών από *in vitro* κυτταροκαλλιέργεια

Τα κύτταρα που επιθυμείται να αναλυθούν με *Western* αναπτύσσονται έως ότου να καταλάβουν όλη την επιφάνεια δύο πλαστικών φιαλών των 75 cm². Έπειτα θρυψινοποιούνται, μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα (Universal) και φυγοκεντρώνται σε 400xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 4 ml PBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, όπως προηγουμένως. Έπειτα, το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε 1 ml PBS, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκεντρείται 400xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 200 μl διαλύματος RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο, 0.1% (w/v) SDS] παρουσία αναστολέων πρωτεασών (1 mM PMSF, 1 μg/ml πεψιστατίνης και 1 μg/ml λευπεπτίνης). Ακολουθεί επώαση του εναιωρήματος σε πάγο για 30 λεπτά, με αναδεύσεις ανά 5 λεπτά με τη χρήση Vortex (30 sec στη μέγιστη περιδίνηση). Κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η λύση των κυττάρων και η εκχύλιση των περισσότερων διαλυτών πρωτεϊνών τους. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 14000xg για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αφήνεται προς συντήρηση στους -80°C. Μέρος του εκχυλίσματος χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης, όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

β. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος πραγματοποιείται μέσω της τεχνικής Bradford, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Η τεχνική βασίζεται στη χρωστική ουσία Coomassie brilliant blue-G 250 που αυξάνει το μέγιστο απορρόφησης της από τα 460 nm στα 595 nm, αφοτου δεσμευθεί σε πρωτεΐνη. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Eppendorf προστίθενται 797 μl απεσταγμένου νερού, 200 μl αντιδραστηρίου Bio-Rad και 3 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα μείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύονται με χρήση Vortex. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται μείγμα 800 μl H₂O/200 BioRad. Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρονται σε κυψελίδα και πραγματοποιείται μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο στα 595 nm.

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος υπολογίζεται βάσει της οπτικής πυκνότητας (αφαιρώντας την οπτική πυκνότητα του μάρτυρα) κάθε δείγματος και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης αλβουμίνης βοός (Bovine Serum Albumin-BSA, New England Biolabs).

γ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες μέσω ηλεκτροφόρησης μιας διάστασης σε πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε ηλεκτρικό πεδίο, ανάλογα με το μέγεθός τους. Πρωτεΐνες μεγάλων μοριακών βαρών διαχωρίζονται σε πηκτές χαμηλής συγκεντρώσεως ακρυλαμιδίου, ενώ το αντίθετο ισχύει για τις μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, για τις οποίες χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου που διακρίνονται σε δύο μέρη: 1) την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel), με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% [5% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED] και μεγάλο μέγεθος πόρων και 2) την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel), με τελική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 10-15%

[10% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.04% (v/v) TEMED] και μικρό μέγεθος πόρων.

Τα μείγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη TEMED (Sigma). Ο πολυμερισμός της πηκτής πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά. Πριν την ηλεκτροφόρηση, στα δείγματα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης [62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0.01% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης] και θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100 °C. Το διάλυμα φόρτωσης αποδιατάσει τις πρωτεΐνες και εξουδετερώνει το ολικό φορτίο τους, ώστε να προκύψει ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μόνο βάσει του μεγέθους. Ακολούθως, τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή και η πραγματοποιείται κάθετη ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτροφορητική συσκευή υπό τάση 100 Volt και ένταση 200mA για περίπου 40 λεπτα σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης [25mM Tris-HCl, 192mM γλυκίνη, 0.1% (v/v) SDS].

δ. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθείται η διαδικασία υγρής μεταφοράς (wet transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς [25 mM Tris-HCl, 192 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη]. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και 2 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού χρωματογραφίας (3 MM Chr, Whatman), καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell), τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής. Ακολούθως, τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς κομμάτια τοποθετούνται στην συσκευή υγρής μεταφοράς με την εξής σειρά: (θετικός πόλος) υαλοβάμβακας - χαρτί Whatman - μεμβράνη νιτροκυτταρίνης – πηκτή - χαρτί Whatman - υαλοβάμβακας (αρνητικός πόλος). Τα κομμάτια τοποθετούνται προσεκτικά απομακρύνοντας τις τυχόν φυσαλίδες, που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ τους και στη συνέχεια η συσκευή πληρώνεται με το διάλυμα μεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ολονύκτια σε σταθερή τάση 35 Volt/ ένταση 90 mA, στους 4°C.

ε. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking) – Επώσεις με αντισώματα

Την επομένη, μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα μη λιπαρού γάλακτος 5% (w/v) σε PBS, για τουλάχιστον 3 ώρες, με σκοπό να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης της μεμβράνης. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με ειδικό πρωτοταγές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, αραιωμένο σε διάλυμα PBS, παρουσία 5% (w/v) μη λιπαρού γάλακτος, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C. Η χρησιμοποιούμενη αραιώση του αντισώματος στο διάλυμα και το χρονικό διάστημα της επώασης εξαρτώνται από την ικανότητα πρόσδεσης του στην προς εξέταση πρωτεΐνη, την ποσότητα της πρωτεΐνης στο κύτταρο καθώς επίσης και από την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στο εξεταζόμενο εκχύλισμα και υπολογίζεται εμπειρικά.

Με το πέρας της επώασης ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μια, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτοταγούς αντισώματος. Έπεται επώαση της μεμβράνης με το δευτεροταγές αντίσωμα, για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Το δευτεροταγές αντίσωμα αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτοταγούς αντισώματος και προσδέεται σε αυτό. Επιπλέον φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραφάνου (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιούνται 2 πεντάλεπτες πλύσεις με PBS όπως προηγουμένως.

στ. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)

Τελευταίο βήμα αποτελεί η ανίχνευση των προς εξέταση πρωτεϊνών με βάση το λογισμικό ChemiDoc XRS, Biorad. Αρχικά η μεμβράνη αφήνεται να αντιδράσει για 5 λεπτά με τα ειδικά αντιδραστήρια (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate – Pierce) της τεχνικής ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Ακολούθως η μεμβράνη τοποθετείται σε πλάκα εμφάνισης, και έπειτα από την πραγματοποίηση κατάλληλων ρυθμίσεων εκτίθεται σε φως για την ανίχνευση του σήματος χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος έκθεσης είναι ανάλογος με την ποσότητα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη.

ζ. Αντισώματα

Ο παρακάτω πίνακας περιλαμβάνει τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Αντίσωμα	Κατασκευάστρια εταιρία	Τύπος
pS235/236-S6	Cell Signaling	anti-rabbit
p62/SQSTM1	Sigma Aldrich	anti-rabbit
LC3B (D11)	Cell Signaling	anti-rabbit
β-Tubulin	Sigma Aldrich	anti-mouse
anti-rabbit HRP	Jackson	secondary
anti-mouse HRP	Jackson	secondary

2.6 Κυτταρομετρία Ροής (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί τεχνική που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση παραμέτρων φθορισμού μονήρων κυττάρων που βρίσκονται σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Λόγω του ότι ο φθορισμός χρησιμοποιείται για την ανάλυση των κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής αναφέρεται και ως φθορισμοενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (Fluorescence Activated Cell Scanning- FACS). Η μέτρηση των κυτταρικών εναιωρημάτων απαιτεί την υδροδυναμική εστίαση σε μια κεντρική ροή και εισαγωγή των κυττάρων ένα-ένα σε μία κυψελίδα ροής και από μια πηγή προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ανάλυση των δειγμάτων αξιοποιεί τη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία, οι οποίες μετρώνται από ειδικούς ανιχνευτές. Η ακτινοβολία, που συνήθως προέρχεται από ένα ή περισσότερα laser, είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών, η οποία μετράται από το κυτταρόμετρο ροής. Ο κυτταρικός πληθυσμός ενός δείγματος διαχωρίζεται σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), η οποία μετράται σε μικρή γωνία 1-19° και καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων και την πλευρική σκέδαση (Side Scatter, SSC), που μετράται στις 90° και καθορίζει την κοκκίωσή των. Η ταυτόχρονη ανάλυση πρόσθιας και πλευρικής σκέδασης σε ένα ιστόγραμμα δύο διαστάσεων επιτρέπει να διαχωριστεί ο πληθυσμός ενδιαφέροντος από ένα ετερογενές μείγμα ή από θραύσματα νεκρών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να απομονωθεί ηλεκτρονικά ο κυτταρικός πληθυσμός ενδιαφέροντος εφαρμόζοντας γύρω από αυτόν μια περίφραξη (gating). Η ανάλυση των υπολοίπων παραμέτρων μπορεί να γίνει με ιστογράμματα έντασης φθορισμού.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την μέτρηση φθορισμού από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP) αλλά και για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό με δευτερεύοντα αντισώματα συζευγμένα με χρωμογόνα ουσία (FITC).

2.6.1 Μέτρηση συχνότητας ρετρομετάθεσης

Η ικανότητα της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής να μετρά την ένταση φθορισμού ενός κυτταρικού δείγματος, μας παρέχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε τα γεγονότα ρετρομετάθεσης ανά κυτταρικό δείγμα σε κύτταρα που φέρουν το ανασυνδυασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο SVA σημασμένο με την ειδική κασέτα ανίχνευσης EGFP. Η παρουσία της EGFP σηματοδοτεί ένα γεγονός ρετρομετάθεσης και η πειραματική πορεία ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της κυτταρομετρίας ροής έχει ως εξής:

Τα προς μελέτη κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα μάρτυρες, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρώνται σε 300xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κυτταρικά ιζήματα εκπλένονται με 100 όγκους διαλύματος PBS και φυγοκεντρώνται όπως προηγουμένως. Τέλος, επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος PBS και μεταφέρονται σε σωληνάρια πολυστυρενίου των 5ml (Becton Dickinson), προκειμένου να αναλυθούν στο κυτταρόμετρο ροής. Αμεταχείριστα κύτταρα χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας εκτίμησης του αυτοφθορισμού (background fluorescence). Τα κατώφλια της έντασης φθορισμού, ορίζονται βάσει της κατανομής της έντασης φθορισμού του μάρτυρα, τέτοια ώστε το 99.60% των κυττάρων να λαμβάνονται ως αρνητικά και το 0.40% ως λανθασμένα θετικά. Κύτταρα των οποίων η ένταση φθορισμού είναι μετατοπισμένη πέρα από 0.40% θεωρούνται θετικά σε ρετρομετάθεση. Το καθαρό ποσοστό των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων υπολογίζεται αφαιρώντας από το ποσοστό αυτών, το ποσοστό των λανθασμένα θετικών κυττάρων (0.40%), βάσει του μάρτυρα. Οι κατανομές φθορισμού απεικονίζονται ως ιστογράμματα φθορισμού και πραγματοποιείται επικάλυψη (overlay) μεταξύ του ιστογράμματος του δείγματος ως προς αυτό του μάρτυρα (βλέπε και ενότητα 3.2.2).

2.6.2 Ανίχνευση επιφανειακών δεικτών μέσω άμεσου ανοσοφθορισμού και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής

Αρχικά τα κύτταρα μάρτυρες και οι προς μελέτη διαμολυσμένοι κλώνοι θρυψινοποιούνται. Με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου Neubauer, μετρώνται 2×10^6 κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 2 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1.500xg και στη συνέχεια αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα εκπλένονται με 2 ml PBS. Έπεται φυγοκέντρηση, όπως και προηγουμένως και το προκύπτον ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml διαλύματος Cell staining buffer (Biolegend), με σκοπό να παρεμποδιστούν όλοι οι Fc υποδοχείς και να μειωθούν οι μη ειδικές δεσμεύσεις. Ακολούθως, τα κύτταρα από κάθε δείγμα διαμοιράζονται σε 2 σωληνάρια πολυστυρενίου των 2 ml (Becton Dickinson), ώστε σε κάθε ένα να προκύπτουν 10^6 κύτταρα. Σε κάθε σωληνάριο, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Cell staining buffer, έως ότου ο τελικός όγκος να φτάνει τα 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σύμφωνα με τις προαναφερθείσες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 100 μl διαλύματος Cell staining buffer. Σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας, ποσότητα $0.2 \mu\text{g}$ αντισώματος είναι αρκετή για σήμανση 10^6 κυττάρων σε τελικό όγκο 100μl. Χρησιμοποιείται 1 μl αντισώματος, που αντιστοιχεί σε 0.1 μg ανά 10^6 κύτταρα σε τελικό όγκο 100 μl. Τα κύτταρα επωάζονται για 15-20 λεπτά σε πάγο στο σκοτάδι. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις προσθέτοντας σε κάθε δείγμα 2 ml διαλύματος PBS και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 3 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και να ξεπλυθούν τα κύτταρα. Τέλος, το ίζημα των κυττάρων κάθε δείγματος επαναιωρείται σε 500-1000 μl διαλύματος Cell staining buffer και τα δείγματα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.

2.6.3 Κυτταρικός κύκλος

Αρχικά τα κύτταρα μάρτυρες και οι προς μελέτη διαμολυσμένοι κλώνοι θρυψινοποιούνται. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 5 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1.500xg, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλένονται με 2 ml PBS.

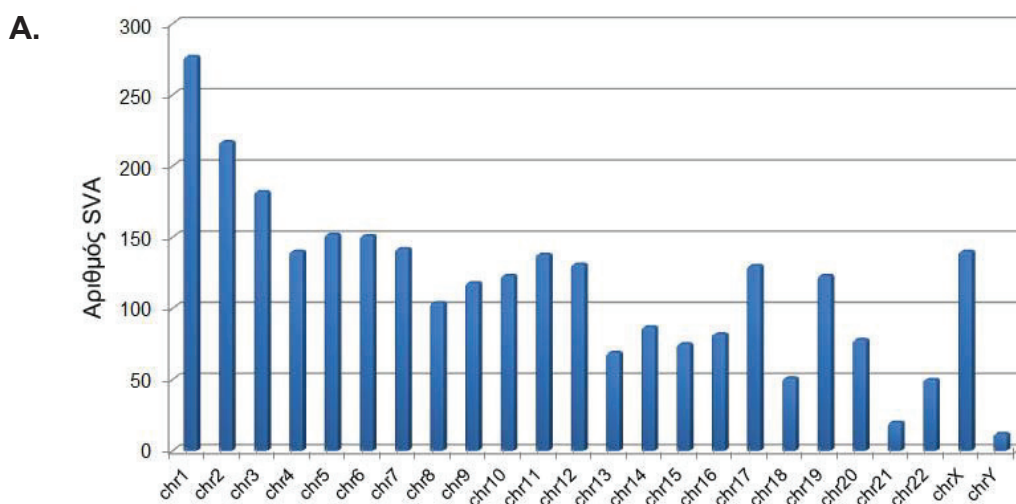
Έπεται φυγοκέντρωση, όπως και προηγουμένως και το προκύπτον ίζημα επαναωρείται σε 500μL διαλύματος PI 50μg/ml το οποίο έχει προκύψει από διάλυση σκόνης Ιωδιούχου Προπιδίου (Santa Cruz) σε υδατικό διάλυμα 0.1% Sodium Acetate, 0.1% TritonX-100. Ακολουθεί επώαση 20 λεπτών στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

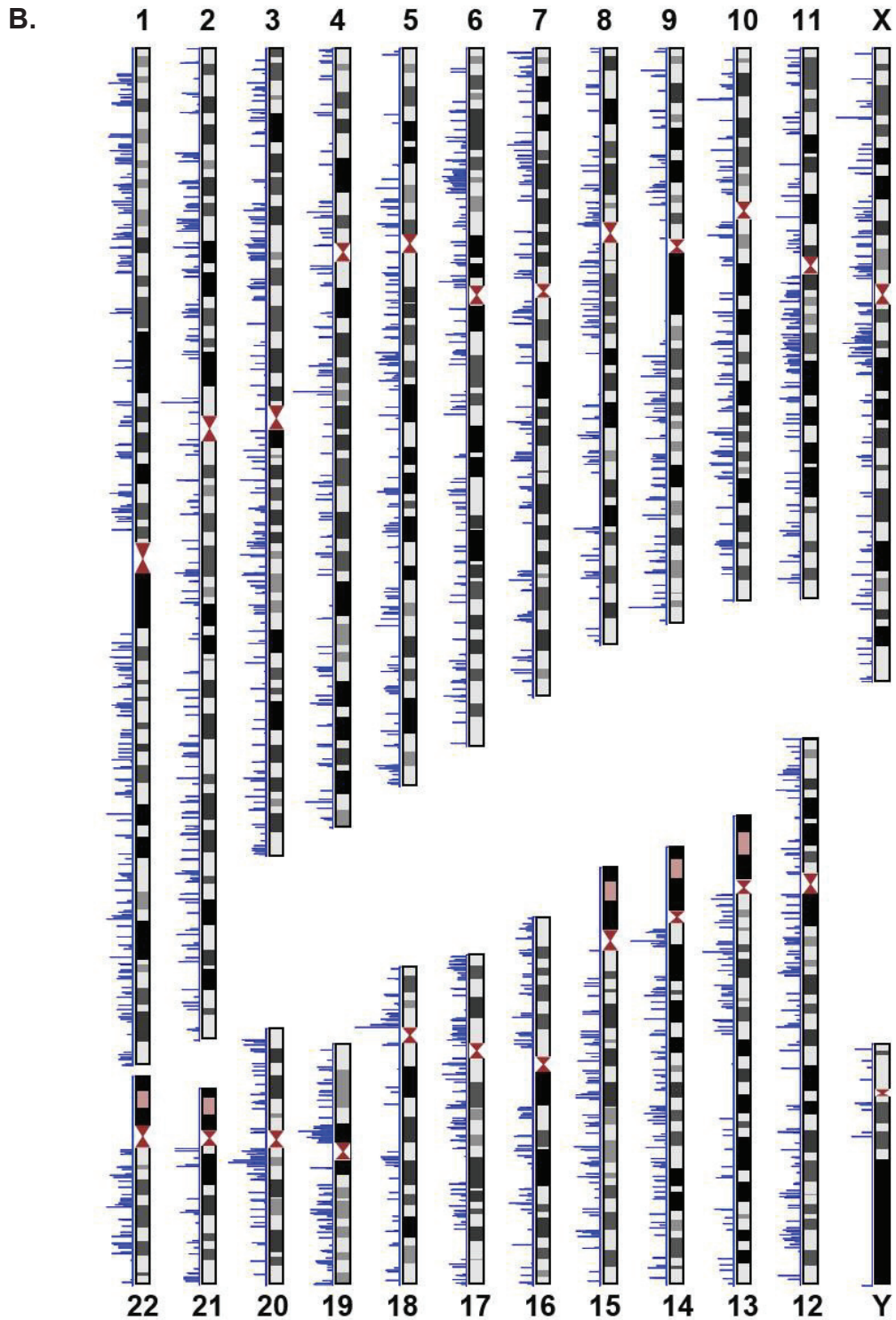
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση των SVA

Τα SVA αποτελούν τη νεότερη και λιγότερο μελετημένη οικογένεια σύνθετων μη αυτόνομων ρετρομεταθετών στοιχείων στον άνθρωπο και έχουν συνδεθεί με αρκετές ασθένειες. Λόγω της πρόσφατης ανακάλυψης καθώς και της ιδιαίτερα ποικιλόμορφης δομής τους, δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφρασή τους καθώς και ο αντίκτυπος που μπορεί να έχουν στο γένωμα. Σε ένα πρώτο στάδιο, μελετήσαμε την κατανομή τους στα διάφορα χρωμοσώματα καθώς και σε ποιες περιοχές εντοπίζονται ως προς τα γονίδια.

Προς αυτή την κατεύθυνση, χρησιμοποιήσαμε τη βάση δεδομένων UCSC Table Browser και το εργαλείο εύρεσης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του ανθρώπινου γενώματος που στηρίζεται στον αλγόριθμο Repeatmasker ώστε να ανακτηθούν όλες οι εγγραφές που αντιστοιχούν σε SVA. Τα δεδομένα που προέκυψαν (~3800 αποτελέσματα) επιθεωρήθηκαν με μη αυτόματο τρόπο ώστε να βρεθούν πιθανά προϊόντα ανασυνδυασμού διαφόρων υποοικογενειών SVA. Έπειτα από αυτή την ανάλυση προέκυψε ότι το ανθρώπινο γένωμα περιέχει 2676 SVA, για τα οποία έγινε γνωστή η γενωμική θέση και η υποοικογένεια που ανήκουν. Ακολούθησε κατηγοριοποίηση ως προς την κατανομή τους στα ανθρώπινα χρωμοσώματα (Εικ 3.1A). Παρατηρούμε στην Εικ.3.1A ότι τα SVA είναι παρόντα σε όλα τα ανθρώπινα χρωμοσώματα, εμφανίζονται δε με μεγαλύτερη συχνότητα στα χρωμοσώματα 17 και 19 ενώ υποεκπροσωπούνται στο Y χρωμόσωμα.

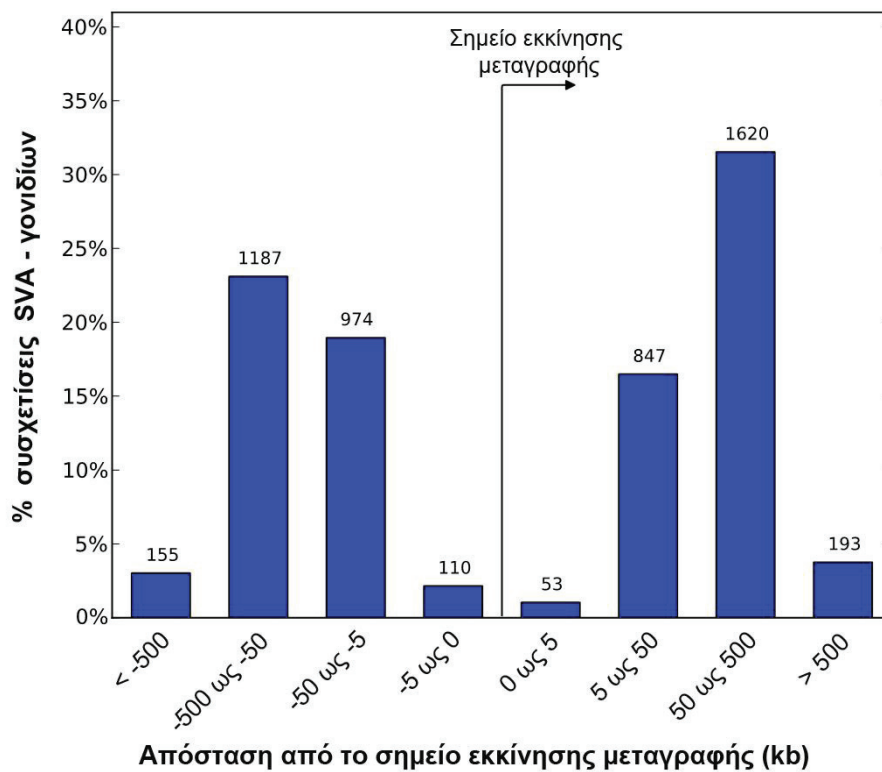




Εικόνα 3.1: Η κατανομή των ρετροτρανσποζονίων *SVA* στο ανθρώπινο γένωμα. **A.** Το γράφημα απεικονίζει τον απόλυτο αριθμό των *SVA* που υπάρχουν σε κάθε ανθρώπινο χρωμόσωμα. **B.** Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου καρυότυπου όπου με μπλε γραμμές επισημαίνονται οι ακριβείς γενωμικές θέσεις των *SVA*. Το μήκος της γραμμής είναι ανάλογο του μήκους του ρετρομεταθετού στοιχείου.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα γενωμικής θέσης εισήχθησαν στη βάση δεδομένων Ensembl και δημιουργήθηκε γράφημα που να παρουσιάζει τις ακριβείς θέσεις όλων των SVA στα ανθρώπινα χρωμοσώματα. Παρατηρούμε πως η κατανομή των SVA εμφανίζει σχεδόν ομοιόμορφη διασπορά με εξαίρεση το μεγάλο βραχίονα στο χρωμόσωμα Υ και τους μικρούς βραχίονες των χρωμοσωμάτων 13, 14, 15, 21 και 22.

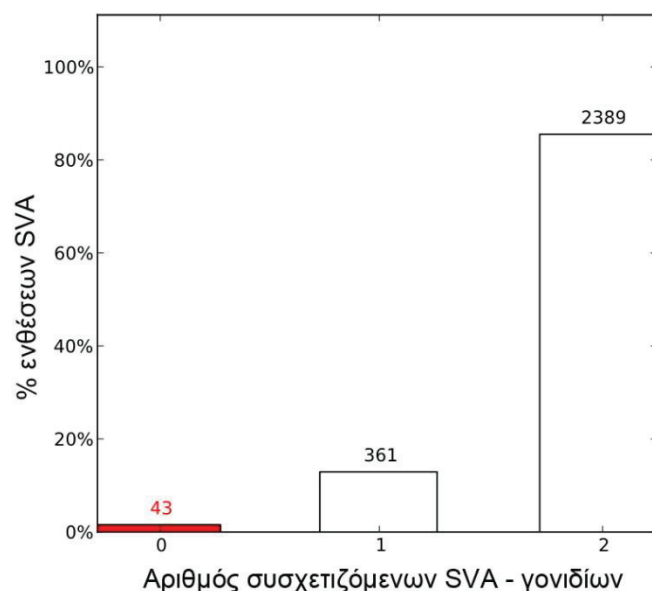
Είναι γνωστό ότι τα μεταθετά στοιχεία φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία που μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφή γονιδίων και το γεγονός ότι δεν είναι γνωστή η θέση των SVA σε σχέση με τα ανθρώπινα γονίδια δεν επέτρεψε να εξαχθούν συμπεράσματα για τον πιθανό τους ρόλο στην γονιδιακή έκφραση μέχρι σήμερα. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα δεδομένα γενωμικής θέσης των SVA εισήχθησαν στην υπολογιστική πλατφόρμα GREAT (Genomic Region Annotation Tool) και αναλύθηκε η πιθανή συσχέτιση των SVA με τις θέσεις έναρξης μεταγραφής ανθρώπινων γονιδίων.



Εικόνα 3.2: Τα SVA συσχετίζονται με την τοπολογία γονιδίων. Το γράφημα κατηγοριοποιεί τα SVA ως προς την απόστασή τους από γονίδια. Συμπεριλαμβάνονται SVA που εντοπίζονται ανοδικά και καθοδικά του σημείου εκκίνησης της μεταγραφής.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής φαίνονται σε δυο γραφήματα: ένα στο οποίο η συσχέτιση γονιδίου-περιοχής κατηγοριοποιείται σύμφωνα με την απόσταση και με τον προσανατολισμό των γονιδίων (Εικ. 3.2) καθώς και ένα δεύτερο όπου

αναφέρεται ο αριθμός των γονιδίων που φαίνεται ότι επηρεάζονται από τα παραπάνω SVA (Εικ. 3.3). Αναφορικά με την Εικ. 3.2 η απόσταση από το σημείο έναρξης της μεταγραφής δείχνει την απόσταση μεταξύ των SVA και των πιθανών ρυθμιζόμενων από αυτά γονιδίων. Οι αποστάσεις υποδιαιρούνται σε 4 κατηγορίες: από 0 – 5kb, από 5 – 50kb, από 50 – 500kb και άνω των 500kb και αναφέρονται σε περιοχές ανοδικά και καθοδικά γνωστών γονιδίων. Η συσχέτιση γονιδίων-στοιχείων SVA κατηγοριοποιείται εκτός από την απόσταση και με τον προσανατολισμό των γονιδίων. Παρατηρούμε πως σχεδόν το σύνολο των SVA βρίσκεται παρακείμενα σε γονίδια και επιπλέον πως η συντριπτική πλειοψηφία των SVA σχετίζεται με 2 γονίδια (2389) ενώ μικρό ποσοστό αυτών -μόλις 43- δε σχετίζονται με κανένα γονίδιο (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.3: Συσχέτιση SVA και αριθμού γονιδίων που δυνητικά επηρεάζονται από αυτά. Τα SVA της Εικ.3.2 κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τον αριθμό των γονιδίων με τα οποία φαίνεται πως συσχετίζονται.

Είναι γνωστό πως τα SVA φέρουν αλληλουχίες που δρουν ως ρυθμιστικά στοιχεία. Δεδομένης της ομοιομορφίας κατανομής τους στα χρωμοσώματα, αναρωτηθήκαμε μήπως η παρουσία τέτοιων επαναλήψεων θα μπορούσε να επιτρέψει ταυτόχρονα τον έλεγχο πολλών γονιδίων, παρέχοντας κοινές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων ή αναστολέων της μεταγραφής. Η ανάλυση έγινε με την πλατφόρμα GREAT που παρέχει επιπλέον τη δυνατότητα συσχέτισης των SVA με οικογένειες γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες.

Γονίδια συσχέτισης	Απόσταση σε ζεύγη βάσεων Θέση Εκκίνησης Μεταγραφής ↓							
	<- 500	- 500 ως - 50	- 50 ως -5	- 5 ως 0	0 ως 5	5 ως 50	50 ως 500	>500
B-ΧΛΛ	0	1	6	0	0	2	5	0
καρκίνος μαστού	0	9	15	0	0	0	15	1
πρωτεΐνη zinc finger	1	16	14	0	0	11	44	2
διπλασιασμός κεντροσωματίου	1	1	3	0	1	1	7	0
Krüppel box	2	35	45	5	5	47	70	3
TNF-μονοπάτι σηματοδότησης	0	0	1	1	0	5	4	0

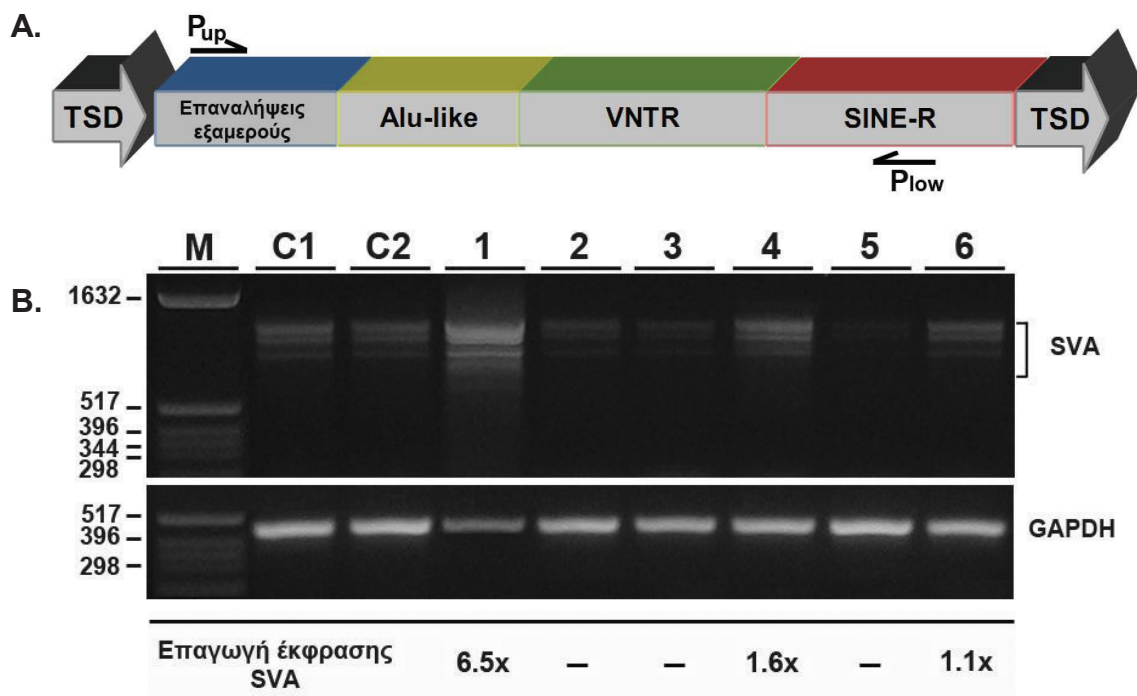
Πίνακας 3.1: Τα SVA γειτνιάζουν με σημαντικά γονίδια. Στον πίνακα τα SVA που σχετίζονται με γονίδια που συμμετέχουν σε συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες κατηγοριοποιούνται αριθμητικά αλλά και ως προς την απόσταση από τη θέση έναρξης της μεταγραφής τους, με συσχετιζόμενα γονίδια που συμμετέχουν σε συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες. Όλες οι ανωτέρω συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$) σε δύο ανεξάρτητα στατιστικά τεστ (υπεργεωμετρικό τεστ και τεστ Bonferroni). B-ΧΛΛ: χρόνια B-λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 τα SVA εντοπίζονται σε περιοχές ανοδικά και καθοδικά γονιδίων που συνδέονται με ασθένειες όπως η χρόνια B λεμφοβλαστική λευχαιμία και ο καρκίνος του μαστού. Επιπλέον, σχετίζονται με γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω διπλασιασμού του κεντροσωματίου, την αναστολή της μεταγραφής και την παραγωγή πρωτεϊνών zinc finger. Τα SVA εμπλέκονται επίσης σε αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού σηματοδότησης TNF.

3.2 Απομόνωση ενός πλήρους μήκους SVA

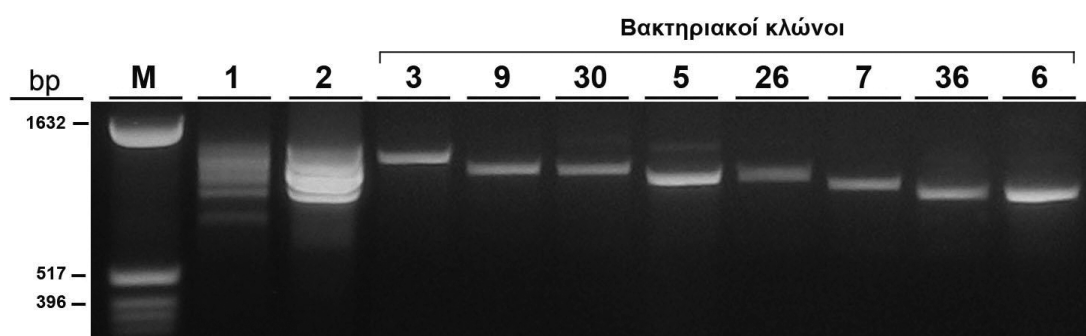
3.2.1 Ανάλυση έκφρασης RNA των SVA σε ανθρώπινες λευχαιμίες

Μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί ένα πλήρους μήκους SVA που να έχει χαρακτηριστεί από υψηλό δυναμικό ρετρομετάθεσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα SVA που έχουν απομονωθεί παρουσιάζουν ποσοστά ρετρομετάθεσης <0.5% σε κυτταρικές καλλιέργειες (51). Προς την κατεύθυνση απομόνωσης ενός ενεργού SVA, αναζητήθηκαν εκφραζόμενα SVA σε ασθενείς με λευχαιμία. Με δεδομένο ότι το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης είναι η μεταγραφή του ρετρομεταθετού στοιχείου, παρασκευάστηκε cDNA από ολικά λευκοκύτταρα. Ως αρχικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος 2 υγιών όπως και 6 ασθενών με κλινικά πιστοποιημένες λευχαιμίες. Σε μια εκ των περιπτώσεων λευχαιμίας, υπήρξε και η δυνατότητα διαχωρισμού των βλαστών λόγω αυξημένου αριθμού τους. Το cDNA που παρασκευάστηκε αποτέλεσε εκμαγείο για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές που σχεδιάστηκαν ειδικά για να ενισχύουν μεταγραφώματα SVA (P_{up} & P_{low}). Στην Εικ. 3.4A απεικονίζονται οι θέσεις των εκκινητών στην πρότυπη αλληλουχία SVA ενώ τα αποτελέσματα της ανάλυσης RT-PCR με τους ειδικούς εκκινητές παρουσιάζονται στην Εικ. 3.4B



Εικόνα 3.4: Απομόνωση αλληλουχιών SVA με RT-PCR: **A.** Θέσεις εκκινήτων στην αλληλουχία SVA P_{up} . 5' εκκινήτης στην περιοχή εξαμερών, P_{low} . 3' εκκινήτης στο μέσο της αλληλουχίας SINE-R. Όπου TSD: Target Site Duplications – Διπλασιασμός αλληλουχίας στόχου, VNTR: Variable number of Tandem Repeats – Μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων **B.** Έκφραση RNA των SVA σε δείγματα ανθρώπινων λευχαιμίων. 1 μ g RNA, απομονωμένο από μη παθολογικά και λευχαιμικά λευκοκύτταρα, μεταγράφηκε αντίστροφα σε cDNA και πραγματοποιήθηκε ανάλυση RT-PCR με τους εκκινήτες P_{up} & P_{low} . Οι διαδρομές C1 και C2 αντιστοιχούν σε μη παθολογικά λευκοκύτταρα, ως μάρτυρα ενώ οι 2, 3, 4, 5 και 6 σε λευκοκύτταρα ασθενών. Στη διαδρομή 1 η αντίδραση αντιπροσωπεύει δείγμα διαχωρισμένου πληθυσμού βλαστών. Η κανονικοποίηση της έκφρασης RNA των SVA έγινε με GAPDH και η επαγωγή της υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος πυκνομετρικής ανάλυσης ImageJ.

Προκειμένου, να διαπιστώσουμε αν οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν ενισχύουν ειδικά αλληλουχίες RNA των SVA αναλύσαμε περαιτέρω τα παραχθέντα προϊόντα RT-PCR με τους εκκινήτες P_{up} - P_{low} (Εικ. 3.4B, διαδρομή 1). Τα προϊόντα αυτά κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα PCR TOPO-II και με το σύνολο των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μετασηματίστηκαν κύτταρα *E.coli*. Έπειτα από αντιβιοτική επιλογή, απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν 40 κλώνοι με σκοπό να καλυφθεί το εύρος των αλληλουχιών SVA διαφορετικού μήκους. Από τους κλώνους αυτούς απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA και ακολούθησε αντίδραση PCR με τους ίδιους εκκινήτες. Το μοριακό μέγεθος κάθε στελέχους SVA που έφερε κάθε κλώνος διαπιστώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.7% w/v.



Εικόνα 3.5: Ανάλυση βακτηριακών κλώνων SVA με αντίδραση PCR. Στη διαδρομή 1 φαίνεται η διαδρομή που ενισχύεται με χρήση των εκκινήτων P_{up} - P_{low} . Η διαδρομή 2 αντιπροσωπεύει συν-ηλεκτροφόρηση 2 μ l από κάθε ένα από τους 8 συνολικά κλώνους. Στις υπόλοιπες διαδρομές παρουσιάζονται οι 8 επιλεγμένοι κλώνοι κατά σειρά ελαττούμενου μοριακού μεγέθους.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 8 τυχαίοι κλώνοι για ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) με μοριακά μεγέθη ενθέματος που αντιστοιχούσαν στο αρχικό εύρος ~800-1600 ζευγών βάσεων της αντίδρασης RT-PCR όπως

παρουσιάζονται στην Εικ. 3.5. Για να επαληθευτεί ότι οι κλώνοι πράγματι φέρουν αλληλουχίες ρετροτρανσποζονίων SVA αλλά και να καθοριστεί η υποοικογένεια στην οποία ανήκουν έγινε σύγκριση νουκλεοτιδικής ομολογίας χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Repeatmasker. Επιπλέον, μέσω της διαδικτυακής βάσης δεδομένων UCSC Genome Browser και τον αλγόριθμο BLAT βρέθηκε η ακριβής θέση καθώς και η φορά τους στο ανθρώπινο γένωμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.2.

Κλώνος	Γενομική θέση	Μήκος (bp)	Φορά	Υποοικογένεια SVA	Ομολογία με SVA
3	<u>Χρωμόσωμα 1</u> (143,540,876-143,544,874)	1372	νοηματική	SVA-D	95%
5	<u>Χρωμόσωμα 2</u> (75,950,569 - 75,953,964)	1131	αντινοηματική	SVA-D	94%
6	<u>Χρωμόσωμα 1</u> (15,519,008 - 15,519,835)	936	αντινοηματική	SVA-D	85%
7	<u>Χρωμόσωμα 5</u> (75,950,569 - 75,953,964)	1068	νοηματική	SVA-D	99,7%
26	<u>Χρωμόσωμα 2</u> (75,950,568 - 75,953,966)	1132	αντινοηματική	SVA-D	94%
30	<u>Χρωμόσωμα 14</u> (70,368,095 - 70,371,760)	1321	νοηματική	SVA-C	100%

Πίνακας 3.2: Πληροφορίες σχετικά με την ακριβή γενομική θέση, το μοριακό μήκος, τη φορά των κλωνοποιημένων SVA στο γένωμα, την υποοικογένεια και την % νουκλεοτιδική ομολογία με γνωστά στελέχη SVA. Στους κλώνους 9 και 36 υπήρξε πρόβλημα κατά την αλληλούχιση και δε συμπεριλαμβάνονται.

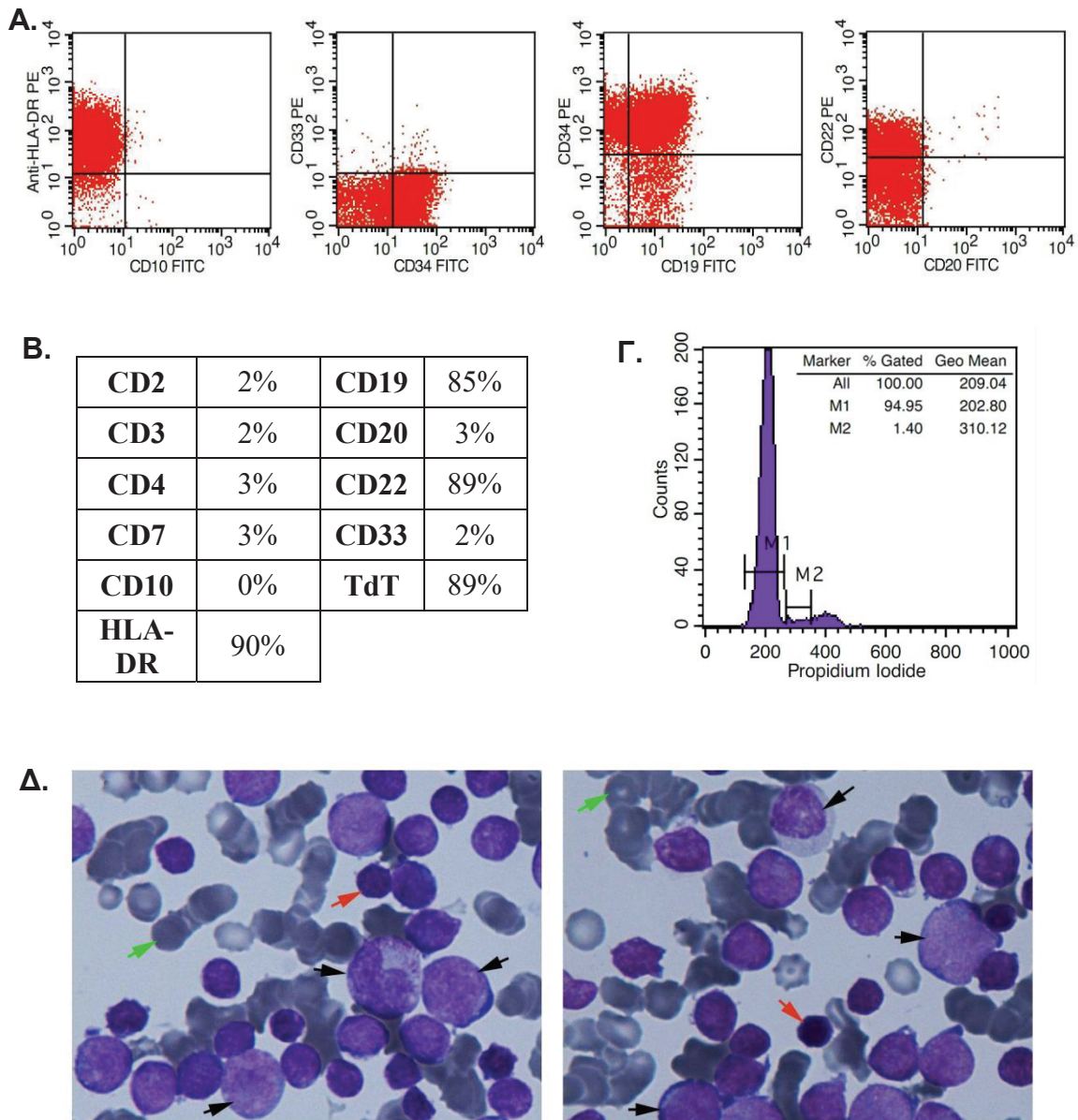
Με δεδομένο ότι οι έξι (6) από το σύνολο των οκτώ (8) ενθεμάτων κλώνων-PCR που αναλύθηκαν παρουσίασαν υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία, μέχρι και 100% με γνωστά στελέχη SVA, οι σχεδιασθέντες εκκινητές είναι ειδικοί για την μελέτη της έκφρασης RNA των SVA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε ο κλώνος 30 με αλληλουχία ομόλογη με SVA-C που εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 εντός του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου SMOC1 (Secreted Modular Calcium-binding protein 1). Σκεπτόμενοι πως η ύπαρξη ενός SVA στο ιντρόνιο ενός γονιδίου μπορεί να προήλθε

από κάποια πρόσφατη ένθεση θεωρήσαμε πως το SVA αυτό ήταν πιθανώς ενεργό και θεωρήθηκε κατάλληλο προς κλωνοποίηση.

3.2.2 Περιγραφή περιστατικού οξείας λευχαιμίας B-κυτταρικής σειράς

Επιλέξαμε ως αρχικό δείγμα αίμα από μια περίπτωση λευχαιμίας που στάλθηκε προς διάγνωση στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Με χρήση του κυτταρομέτρου ροής εντοπίστηκε ο παθολογικός πληθυσμός των λεμφοκυττάρων-βλαστών με τριπλό φθορισμό dimCD45PerCP μέσω έκφρασης των δεικτών CD19+, HLA-DR+, CD22+, CD34+ και TdT+ σε ποσοστό 90%. Ο ανοσοφαινότυπος αυτός είναι συμβατός με οξεία B-λεμφοβλαστική λευχαιμία. Παράλληλα η ανάλυση κυτταρικού κύκλου δεν κατέδειξε συνοδά φαινόμενα κυτταρικού θανάτου (Εικ. 3.6).

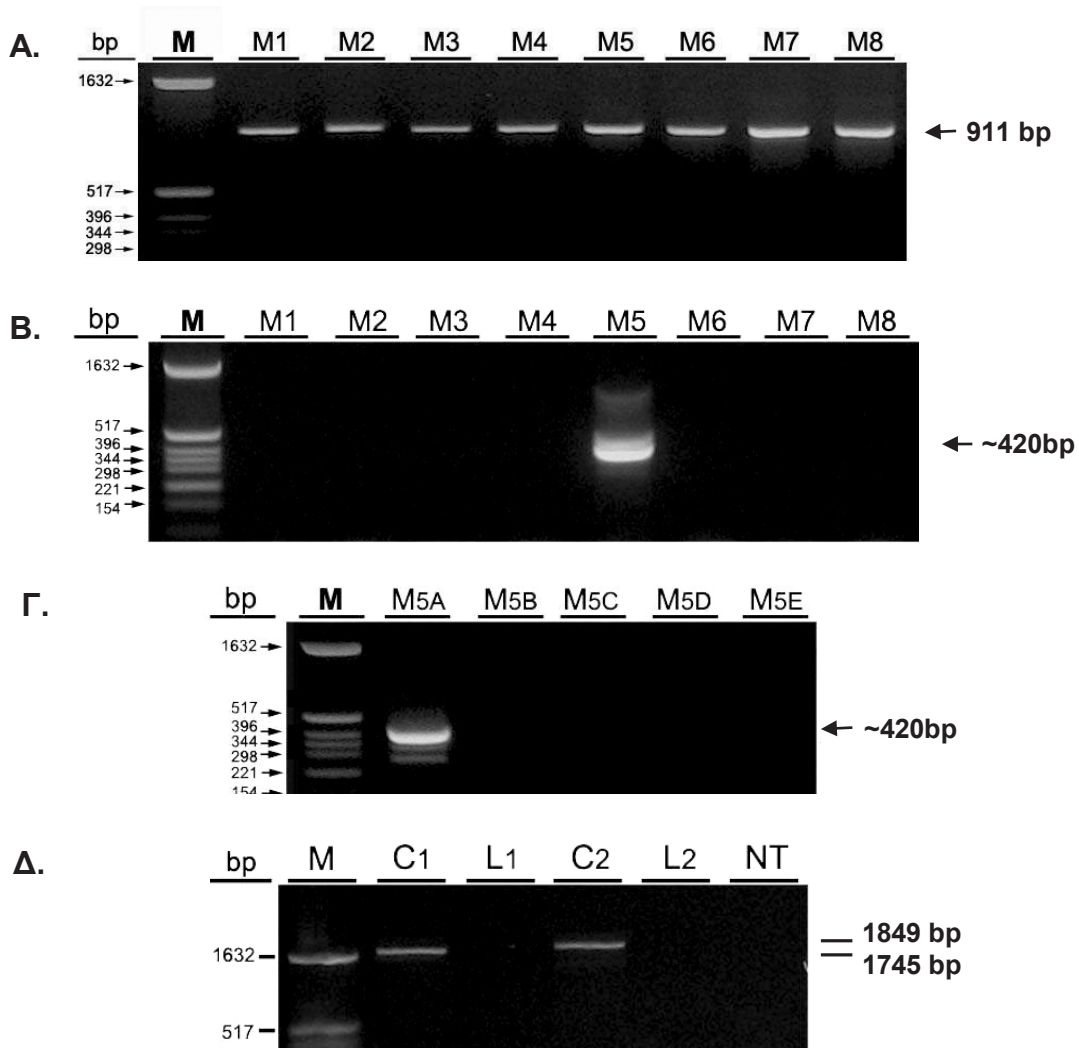
Εν συνεχεία, ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων-βλαστών επιλέχθηκε (gate) και, με χρήση του κυτταρομέτρου ροής, διαχωρίστηκε από τον πληθυσμό των φυσιολογικών κυττάρων (cell sorting). Από τα λεμφοκύτταρα αυτά απομονώθηκε DNA, καθώς και RNA που μεταγράφηκε αντίστροφα σε cDNA. Έπειτα, το cDNA αναλύθηκε για ταυτοποίηση σχετιζόμενων με λευχαιμία χρωμοσωμικών μετατοπίσεων μέσω RT-PCR, χρησιμοποιώντας το πακέτο αντιδραστηρίων (Kit) HemaVision και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μέσω αυτού μπορούν να ανιχνευθούν 28 διαφορετικές χρωμοσωμικές μετατοπίσεις (translocations) ή ανακατατάξεις που περιλαμβάνονται σε περισσότερα από 80 σημεία θραύσης DNA ή ποικίλα mRNA ματίσματα που έχουν συσχετισθεί με συγκεκριμένους τύπους λευχαιμίας. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης προκύπτει μία ζώνη 911 bp του εσωτερικού μάρτυρα της βιοτινιδάσης που αποτελεί ένδειξη λειτουργικότητας της αντίδρασης ενώ στην περίπτωση που υπάρχει μετατόπιση εμφανίζεται και μια δεύτερη, μικρότερη ζώνη σε κάποια από τις 8 διαδρομές. Ανάλογα με τη διαδρομή στην οποία θα εμφανιστεί η μικρότερη ζώνη ακολουθεί επανάληψη της αντίδρασης με ειδικούς εκκινητές που ταυτοποιούν τα γονίδια που εμπλέκονται στη μετατόπιση.



Εικόνα 3.6: **A.** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής σε δείγμα περιφερικού αίματος και **B.** πίνακας ποσοστών έκφρασης των χαρακτηριστικών για την ΟΑΛ, δεικτών διαφοροποίησης (CD-Cluster of Differentiation) **Γ.** Ο κυτταρικός κύκλος δεν ταυτοποίησε παρουσία ανεϋπλοειδικού πληθυσμού και κυτταρικό θάνατο ($G_0/G_1=94,73\%$, $S=1,14\%$, $G_2/M=3,8\%$). **Δ.** Χρώση δείγματος περιφερικού αίματος με Giemsa. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τα κύτταρα βλάστες, τα κόκκινα τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και τα πράσινα τα ερυθροκύτταρα.

Η προαναφερθείσα μοριακή ανάλυση ταυτοποίησε: **α.** την ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των χρωμοσωμάτων 4 και 11 που εμπλέκει τα γονίδια MLL/AF4 καθώς και **β.** μία μη αναμενόμενη απουσία αντίδρασης του εσωτερικού μάρτυρα 911 bp της αντίδρασης, (Εικ.3.7 Β, Γ) που κανονικά εμφανίζεται σε όλες τις

αντιδράσεις (Εικ. 3.7 Α) και αντιπροσωπεύει τμήμα του μεταγραφήματος του γονιδίου της βιοτινιδάσης.



Εικόνα 3.7: Ανάλυση RT-PCR δείγματος ασθενούς με Β-λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Α. Αντιδράσεις σε δείγμα ασθενούς χωρίς χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Διακρίνεται σε όλες τις διαδρομές η ύπαρξη του εσωτερικού θετικού μάρτυρα των 911 bp. Β & Γ: Ταυτοποίηση χρωμοσωμικής μετατόπισης $t(4;11)(q21;q23)$ με εμπλεκόμενα γονίδια τα *MLL1/AF4* και μη ανίχνευση του εσωτερικού θετικού μάρτυρα των 911 bp. Δ. Επιβεβαίωση της απουσίας ανίχνευσης μεταγραφήματος βιοτινιδάσης μέσω των εκκινητών $U_{B189/L_{B1934}}$ (διαδρομές C1 & L1) & $U_{B18/L_{B1867}}$ (διαδρομές C2 & L2) στους βλάστες. Οι διαδρομές C1 και C2 αντιπροσωπεύουν μη ασθενή ενώ εκείνες των L1 και L2 τον λευχαιμικό ασθενή. Όπου NT: αντίδραση χωρίς εκμαγείο και M: δείκτης μοριακών μεγεθών *pBR322/HinfI*.

Με στόχο να διερευνηθεί η απουσία του μεταγραφήματος της βιοτινιδάσης, σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών τέτοια ώστε να ενισχύουν το μεγαλύτερο δυνατό τμήμα του μεταγραφήματος. Τα προϊόντα της RT-PCR αντίδρασης σε cDNA από τα

λευχαιμικά κύτταρα (διαδρομές L1 και L2) και από μη παθολογικά λευκοκύτταρα (διαδρομές C1 και C2) αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Όπως προκύπτει από την *Εικ. 3.7 Δ* το μεταγράφημα της βιοτινιδάσης απουσιάζει πλήρως στην περίπτωση της λευχαιμίας που αναλύθηκε.

3.2.3 Κλωνοποίηση του στοιχείου SVA που εδράζεται στο γονίδιο SMOC-1

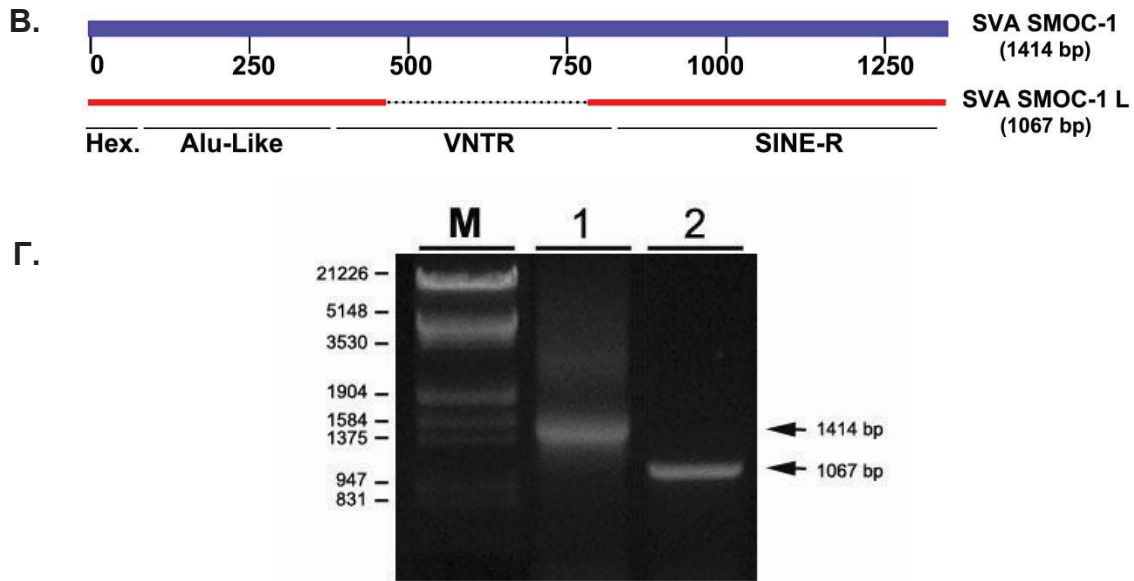
Στη συνέχεια, από τα διαχωρισμένα λευκά αιμοσφαίρια του προαναφερθέντος ασθενούς απομονώθηκε DNA. Με τη βοήθεια του αλγορίθμου UCSC Genome Browser, ανακτήθηκε η αλληλουχία βάσεων του 1^{ου} ιντρονίου του γονιδίου SMOC-1 ανοδικά και καθοδικά του στοιχείου SVA που θέλαμε να απομονώσουμε. Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινήτες στις περιοχές του ιντρονίου που γειτνιάζουν με το ρετρομεταθετό στοιχείο και ακολούθησε Nested PCR που παρήγαγε μοναδική ζώνη. Έπειτα από αλληλούχιση του παραγόμενου προϊόντος, επιβεβαιώθηκε πως επρόκειτο για το επιθυμητό SVA.

A.

```

GCCCTGAGACCACCCTTTAAGAAAACCATCTAGCCCTCTCCCTCTCCCTCTCCCCACGGTCTCC
CTCTCCCTCTCTTTCCACGGTCTCCCTCTGATGCCGAGCCGAAGCTGGACTGTACTGCCGCCA
TCTCTGCTCACTGCAACCTCCCTGCCTGATTCTCCTGCCTCAGCCTGCCGAGTGCCTGCGATT
GCAGGCGCGCCGCCACGCCTGACTGGTTTTCGTATTTTTTGGTGGAGACGGGGTTTTCGC
TGTGTTGGCCGGGCTGGTCTCCAGCTCCTAACTGCGAGTGATCTGCCAGCCTCGGCCTCCCA
AGGTGCCGGGATTGCAGACGGAGTCTCGTTCAGTGTGCTCAGTGTGCTAGGCTGGAGT
GCAGTGGCGTGATCTCGGCTCGCTGCAACCTCCACCTCCAGCCGCCTGCCTTGGCCTCCCA
AAGTGCCTAGATTGCAGCCTCTGCCAGCCGCCACCCCGTCTGGGAGGTGTACCCAACAGCT
CATTGAGAACGGGCCATGATGACGATGGCGGTTTTGTGCAATAGAAAAGGGGAAATGTGGG
GAAAAGATAGAGAAATCAGATTGTTGCTGTGTCTGTGTAGAAAGAAGTAGACATAGGAGACTC
CATTTTGTCTGTACTAAGAAAGATTCTCTGCCTTGGGATGCTGTTGATCTACGACCTTACCC
CCAACCCGGTGCTCTCTGAAACATGTGCTGTGTCCAGTCAGGGTTAAATGGATTAAGGGCGGT
GCAAGATGTGCTTTGTTAAACAGATGCTTGAAGGCAGCATGCTCGTTAATAGTCATCACCCT
CCCTAACCTCAAGTACCCAGGGACACAAACACTGCGGAAGGCCCCAGGGTCTCTGCCTAGG
AAAACCAGAGACCTTTGTTCACTTGTTTATCTGCTTACCTCCCTCCACTATTGTCCTATGACCC
TGCCAAATCCCCCTCTGCAAGAAACACCCAAGAATGATCAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAA
GAAAACCATCTAACCTACTGGAGGAGGAGAGGTCACGTGGAGCAGAACC GAAGTCCCCTAA

```

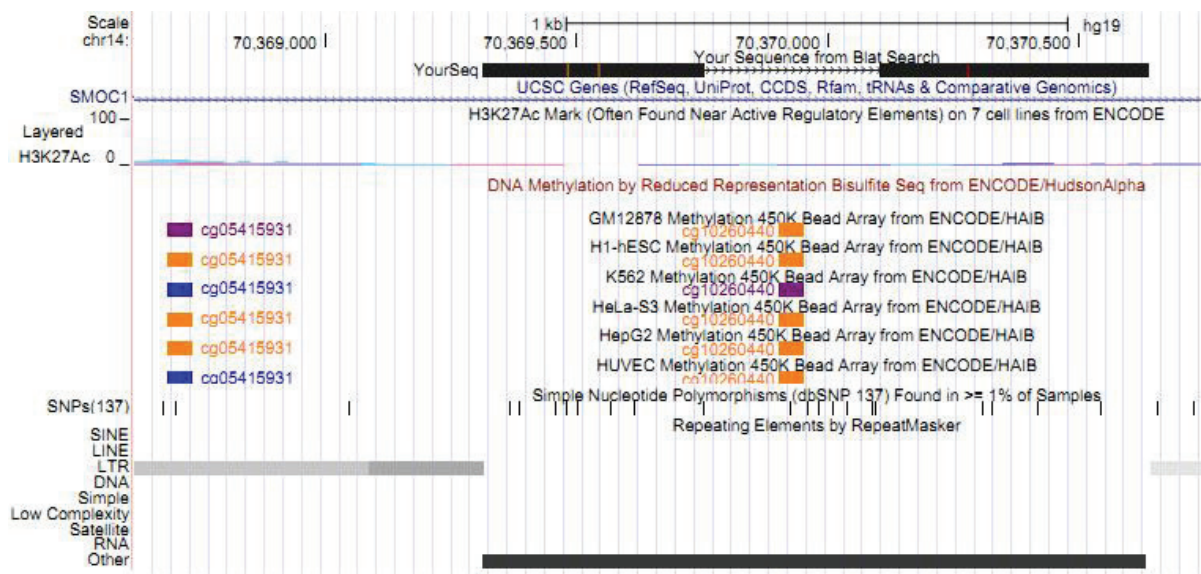


Εικόνα 3.8: *A.* Η αλληλουχία βάσεων του $SVASMOCI-L$. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η περιοχή $SMOC-1$. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η περιοχή εξαμερών, με κίτρινο η *Alu-like*, με κόκκινο η *VNTR*, με μωβ η *SINE-R* και με μαύρα υπογραμμισμένα γράμματα η ουρά πολυ-*A*. **B.** Διαγραμματική σύγκριση αλληλουχίας $SVASMOCI$ από το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (NCBI) με το $SVASMOCI-L$ από λευχαιμικά λευκοκύτταρα. Σημειώνεται η έλλειψη 347 νουκλεοτιδίων στην περιοχή *VNTR* στο $SVASMOCI-L$. **Γ.** Επιβεβαίωση ύπαρξης ελλειμματικού *VNTR* με PCR. Η διαδρομή 1 αντιστοιχεί σε μη παθολογικό DNA ενώ η 2 στον λευχαιμικό ασθενή. *M*: δείκτης μοριακών μεγεθών λ /*HindIII/EcoRI*.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε το εξής: ενώ το προϊόν ενίσχυσης των ειδικών εκκινήτων είχε αναμενόμενο μέγεθος 1414 ζεύγη βάσεων, η αλληλουχία του $SVASMOCI$ που κλωνοποιήθηκε είχε μήκος 1067 ζεύγη βάσεων. Ακολούθησε σύγκριση της αλληλουχίας που κλωνοποιήθηκε με την προβλεπόμενη αλληλουχία $SMOC-1$ από το NCBI και βρέθηκε ότι το $SVASMOCI$ έφερε ένα ελλειμματικό τμήμα *VNTR* κατά 347 νουκλεοτίδια (Εικ. 3.8). Η δεδομένη αλληλουχία του SVA του λευχαιμικού ασθενούς θα αναφέρεται εφ' εξής ως $SVASMOCI-L$.

3.2.4 Ανάλυση του προφίλ μεθυλίωσης του $SVASMOCI-L$

Χρησιμοποιώντας τον Genome Browser του Πανεπιστημίου UCSC αναλύσαμε την αλληλουχία του $SVASMOCI-L$ ως προς την παρουσία μεθυλιωμένων CpG δινουκλεοτιδίων χρησιμοποιώντας πληροφορίες που έχουν προκύψει από αποτελέσματα πειραμάτων του ENCODE.

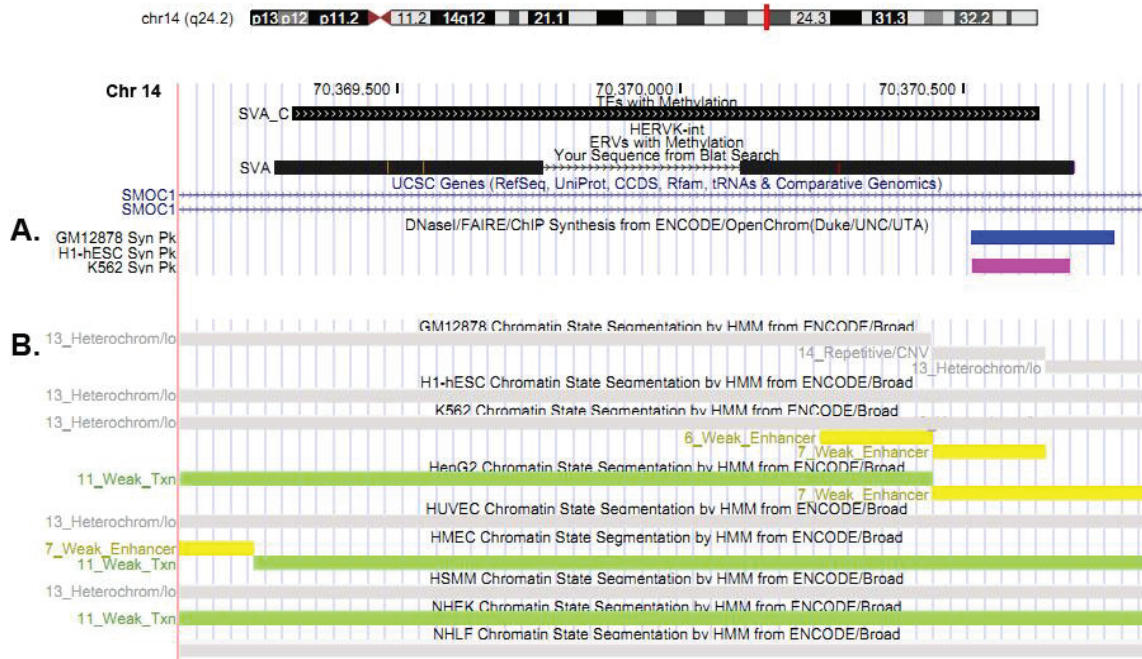


Εικόνα 3.9: Ανάλυση της αλληλουχίας $SV_{SMOC-IL}$ για την παρουσία θέσεων μεθυλίωσης. Τα σημεία της αλληλουχίας του DNA που υπόκεινται σε μεθυλίωση παρουσιάζονται με χρωματιστά κουτιά. Η ανάλυση της ίδιας αλληλουχίας έχει γίνει σε 6 γνωστές κυτταρικές σειρές. Το πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχεί σε μεθυλιωμένη, το μωβ σε μερικώς μεθυλιωμένη και το γαλάζιο σε μη μεθυλιωμένη περιοχή.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9, η περιοχή που απουσιάζει στο VNTR του στοιχείου $SV_{SMOC-IL}$ περιλαμβάνει θέσεις μεθυλίωσης που έχουν πιστοποιηθεί σε 6 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, πριν και μετά το στοιχείο αυτό, υπάρχουν ρετρομεταθετά στοιχεία LTR.

Στην Εικόνα 3.10 απεικονίζονται επιπλέον περιοχές ευχρωματινής ή/και περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που αναγνωρίζονται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους από μια ή περισσότερες από τις παρακάτω μεθόδους: υπερευαισθησία σε DNaseI (Duke DNaseI HyperSensitivity-HS), υποβοηθούμενη από φορμαλδεΰδη απομόνωση ρυθμιστικών στοιχείων (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements -FAIRE) και ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (ChIP). Μέσω ενσωμάτωσης δεδομένων ChIP-seq και με τη βοήθεια του μοντέλου Hidden Markov, επισημαίνονται προβλεπόμενα ρυθμιστικά στοιχεία. Παρατηρούμε πως η περιοχή SINE-R θεωρείται ως ρυθμιστικό στοιχείο στις κυτταρικές σειρές GM12878 και K562. Η περιοχή που εντοπίζεται το στοιχείο $SV_{SMOC1-L}$ αποτελεί σε κάποιες κυτταρικές σειρές μέρος ετεροχρωματίνης (GM12878, K562, HSMM, NHLF, HUVEC), σε άλλες μεταγράφεται ασθενώς (HMEC, HepG2, NHFK) ενώ σε κάποιες περιπτώσεις,

συνιστώσες του SVA όπως η περιοχή SINE-R και οι επαναλήψεις εξαμερών, φαίνεται πως λειτουργούν ως ενισχυτές.



Εικόνα 3.10: **A.** Πρόβλεψη ρυθμιστικών στοιχείων στην αλληλουχία $SVA_{SMOC1-L}$: με μπλε συμβολίζονται περιοχές υψηλής στατιστικής σημασίας (p -value < 0.01). Με ροζ συμβολίζονται οι περιοχές που αναγνωρίζονται ως σημεία πρόσδεσης για ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω: RNA πολυμεράση II, μεταγραφικός καταστολέας CTCF και το *c-Myc* (p -value < 0.05). **B.** Ανάλυση της αλληλουχίας $SVA_{SMOC1-L}$ ως προς την κατάσταση κατακερματισμού της χρωματίνης: Με γκρι συμβολίζονται περιοχές ετεροχρωματίνης ή επαναλαμβανόμενες, με κίτρινο αδύναμοι ενισχυτές και με ανοιχτό πράσινο περιοχές που μεταγράφονται σε χαμηλό ρυθμό.

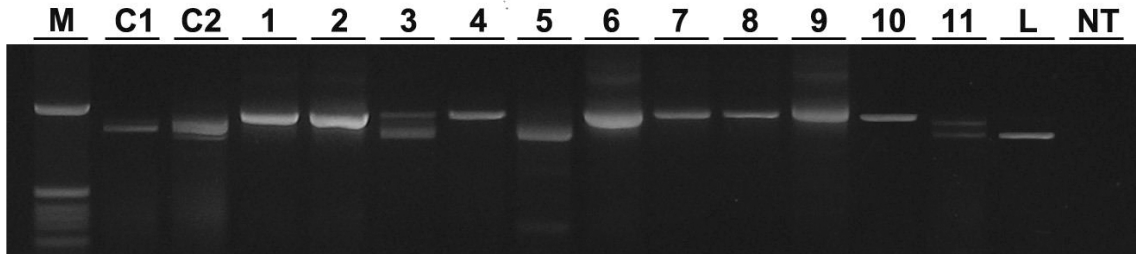
3.2.5 Εξέταση λευχαιμικών δειγμάτων ως προς την έλλειψη των 347 ζευγών βάσεων

Η ανωτέρω περίπτωση λευχαιμίας ανέδειξε ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του $SVA_{SMOC1-L}$ που είναι η έλλειψη των 347 ζευγών βάσεων. Λαμβάνοντας υπόψιν τα στοιχεία από το πρόγραμμα ENCODE, φαίνεται ότι η συγκεκριμένη έλλειψη το κατέστησε μεταγραφικά ενεργό και εν δυνάμει ρετρομεταθετικά ενεργό.

Για το λόγο αυτό, θελήσαμε να εξετάσουμε δείγματα DNA και άλλων ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία για το αν έφεραν την παρατηρηθείσα έλλειψη των 347bp στο αντίστοιχο SVA. Χρησιμοποιήσαμε 11 δείγματα DNA από περιπτώσεις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και 2 δείγματα DNA από λευκοκύτταρα υγιών, ως μάρτυρα. Στα δείγματα αυτά έγινε ανάλυση PCR με τους

ειδικούς για το SVA εκκινητές, ώστε να ελεγχθεί το μοριακό μήκος του SVA που εντοπίζεται στο γονίδιο SMOC-1.

Παρατηρήσαμε ότι, στους 3 εκ των 11 ασθενών (Εικ. 3.11, διαδρομές 3, 5, 11) εμφανίζεται η διαδρομή η οποία αντιστοιχεί στο SVA που φέρει την έλλειψη, όπως φαίνεται κατά τη σύγκριση με το αρχικό λευχαιμικό δείγμα (Εικ. 3.11, διαδρομή L).

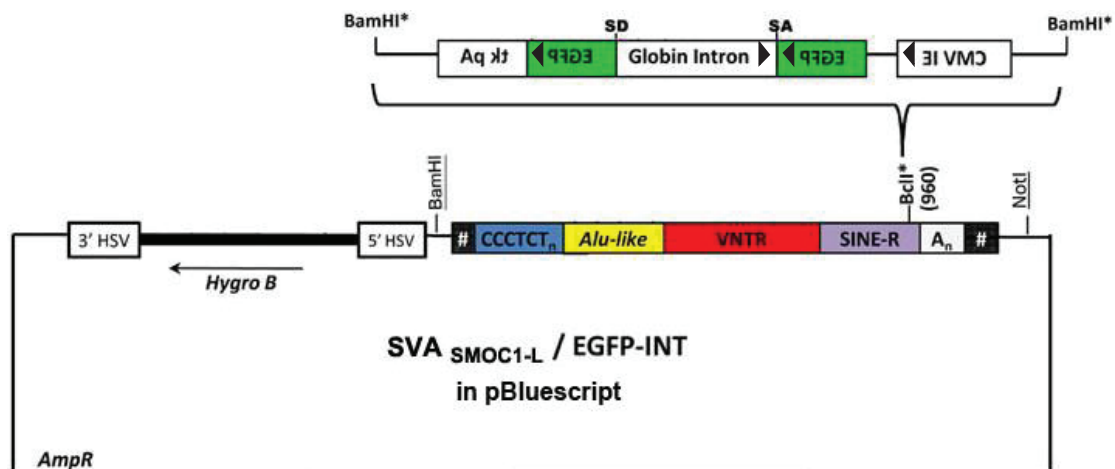


Εικόνα 3.11: Έλεγχος μοριακού μήκους του $SVA_{SMOC1-L}$ σε δείγματα ανθρώπινων λευχαιμιών. Πραγματοποιήθηκε Nested PCR με χρήση των εκκινητών $U_{Rem} - L_{Rem}$ και $U_{Prox} - L_{Prox}$. **C1,C2:** DNA υγιών λευκοκυττάρων, **1-11:** δείγματα DNA λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, **12:** DNA του προαναφερθέντος περιστατικού λευχαιμίας, **NT:** αντίδραση χωρίς DNA.

Συνεπώς, η έλλειψη των 347bp δεν αφορούσε ένα μεμονωμένο γεγονός έλλειψης που συνέβη στο συγκεκριμένο ρετροτρανσποζόνιο $SVA_{SMOC1-L}$ και η συγκεκριμένη γενωμική θέση φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πολυμορφική.

3.3 Σήμανση του ρετροτρανσποζονίου $SVAS_{MOC1-L}$ με κασέτα ανίχνευσης ρετρομετάθεσης

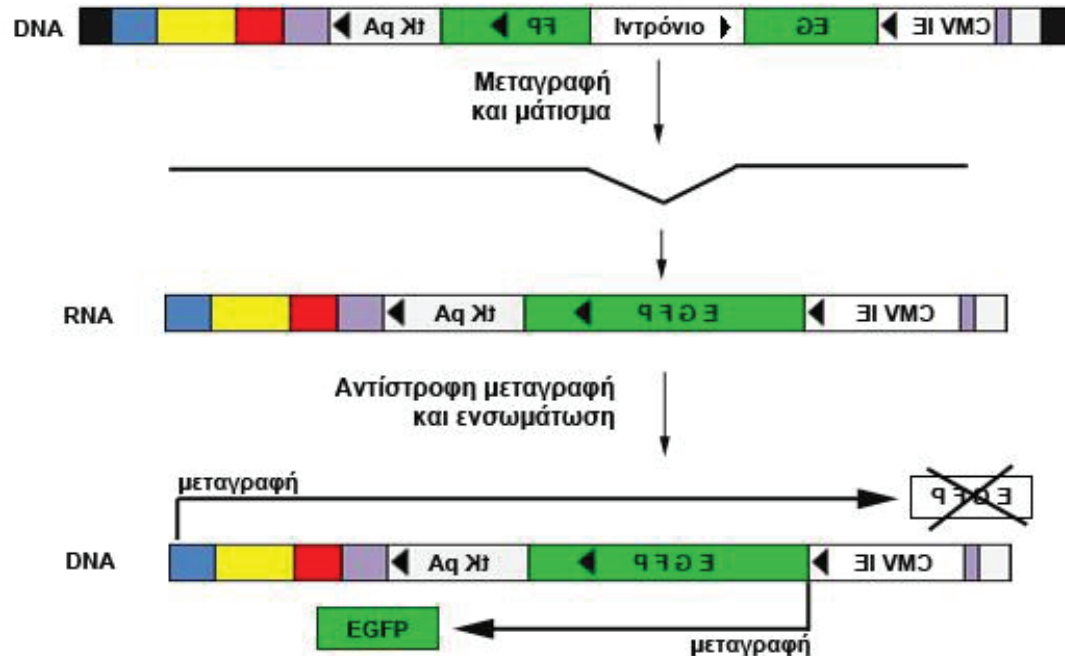
Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν το ρετροτρανσποζόνιο $SVAS_{MOC1-L}$ έχει δυνατότητα παραγωγής γεγονότων ρετρομετάθεσης, ακολούθησε σήμανση του με κασέτα ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης (238). Η κασέτα αποτελείται από τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) που οδηγεί την έκφραση του γονιδίου της EGFP, στην αλληλουχία του οποίου παρεμβάλλεται το γ-ιντρόνιο της β-σφαιρίνης σε αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς τον υποκινητή CMV (Εικ. 3.12).



Εικόνα 3.12: Πλασμιδιακή κατασκευή ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης του ρετροτρανσποζονίου $SVAS_{MOC1-L}$. Οι αλληλουχίες μεταξύ *BamHI* και *NotI* αντιπροσωπεύουν το $SVAS_{MOC1-L}$ στο πλασμίδιο *pBluescript-HygroB*. Αριστερά του $SVAS_{MOC1-L}$ εντοπίζεται μία πλήρης μεταγραφική μονάδα της Υγρομυκίνης Β. Στο 3' άκρο της περιοχής *SINE-R*, η θέση περιορισμού *BclI* αντιστοιχεί στη θέση κλωνοποίησης της κασέτας *EGFP-INT* (πάνω μέρος της εικόνας). Τα μαύρα τετράγωνα εκατέρωθεν του $SVAS_{MOC1-L}$ υποδηλώνουν αλληλουχίες *SMOC-1*. Οι περιοχές *CMV IE*, *EGFP*, *SD* & *SA*, και *tk pA* αντιστοιχούν: στον υποκινητή (*Early Immediate*) του κυτταρομεγαλοϊού, πράσινη φθορισμογόνο πρωτεΐνη, δέκτη & δότη ματίσματος (*Splicing donor* και *Splicing Acceptor*) και πολυ-Α της θυμιδινικής κινάσης.

Η αλληλουχία $SVAS_{MOC1-L}$ μαζί με τις εκατέρωθεν ιντρονικές αλληλουχίες *SMOC-1* κλωνοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων *BamHI* και *NotI* στο πλασμίδιο *pBluescript-HygroB*, που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Υγρομυκίνη, διευκολύνοντας την επιλογή διαμολυσθέντων ευκαρυωτικών κυττάρων. Στη συνέχεια η κασέτα *EGFP* κλωνοποιήθηκε στη μοναδική θέση περιορισμού *BclI*, μεταξύ του 3' άκρου της αλληλουχίας *SINE-R* και πολυ-Α του $SVAS_{MOC1-L}$ σε αντίθετη φορά με αυτή του *SVA* (Εικ.3.12). Δημιουργήθηκε, έτσι, το πλασμίδιο *pBLS-HygroB/SVAS_{MOC1-L}/EGFP-INT*.

Η θέση BclII επιλέχθηκε με το διαφαινόμενο πλεονέκτημα ότι: **α.** δε διακόπτει ή επηρεάζει τη μεταγραφή του SVA από υποκινητές που χαρτογραφούνται σε ανοδικά υπάρχουσες αλληλουχίες καθώς και **β.** βρίσκεται σε εγγύτητα με το πολυ-A του ρετροτρανσποζονίου.



Εικόνα 3.13: Η λογική ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης SVA μέσω της κασέτας EGFP. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί ένα γεγονός ρετρομετάθεσης είναι η μεταγραφή του στοιχείου από τον υποκινητή του, το μάτισμα του ιντρονίου, η αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση του στοιχείου και, τελικώς, η έκφραση της EGFP από τον υποκινητή CMV IE.

Η λογική ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης βασίζεται στην κλωνοποίηση της κασέτας EGFP σε αντίθετη φορά μεταγραφής σε σχέση με το στοιχείο SVA. Η εκκίνηση της μεταγραφής από το 5' άκρο του $SVA_{SMOCI-L}$ θα δημιουργήσει ένα υβριδικό μεταγράφημα στοιχείου/κασέτας που θα υποστεί μάτισμα στη θέση του ιντρονίου της σφαιρίνης το οποίο βρίσκεται στην ίδια μεταγραφική φορά με αυτή του στοιχείου (Εικ. 3.13). Το γονίδιο της EGFP όμως δε θα εκφραστεί παρά μόνο αν το υβριδικό μεταγράφημα μεταγραφεί αντίστροφα σε cDNA και ενσωματωθεί σε μία νέα θέση στο γένωμα. Πλέον, υπό του CMV, θα εκφράζεται λειτουργική πρωτεΐνη EGFP σηματοδοτώντας τη γένεση ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης.

3.4 Έλεγχος τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης SVA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Είναι γνωστό ότι η ρετρομετάθεση συμβαίνει με μία εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα σε μη-μετασχηματισμένα κύτταρα. Αντιθέτως, η συχνότητα αυτή αυξάνει σε καρκινικές κυτταρικές σειρές *in vitro* (65). Με βάση το δεδομένο αυτό θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η κατασκευή SVAS_{SMOC1-L}/EGFP-INT (Εικ. 3.12) είναι λειτουργική στην παραγωγή γεγονότων ρετρομετάθεσης. Συνοπτικά, για το λόγο αυτό διαμόλυνουμε μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) πέντε διαφορετικές κυτταρικές σειρές: HeLa, A549, H1299, HUT-78, Jurkat και Jurkat-Bcl-2 (σταθερή κυτταρική σειρά που εκφράζει την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2). Ακολούθησε κυτταρική επιλογή παρουσία συγκεκριμένων -ανά κυτταρική σειρά- συγκεντρώσεων Υδρομυκίνης B και μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (FACS).

3.4.1 Έλεγχος απόδοσης των συνθηκών ηλεκτροδιάτρησης

Η απόδοση των συνθηκών ηλεκτροδιάτρησης (βλέπε *Υλικά & Μέθοδοι*) έγινε με διαμόλυνση 5×10^6 κυττάρων από κάθε κυτταρική σειρά με το πλασμίδιο EGFP-N1 που κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP. Ακολούθησαν μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής έπειτα από 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση και τα ποσοστά των κυττάρων που διαμόλυνθηκαν επιτυχώς και συνεπώς εκφράζονταν σε αυτά η EGFP, φαίνονται στο παρακάτω γράφημα:

		24h	48h
H1299	Μάρτυρας	0.4%	0.4%
	EGFP-N1	67%	69%
	Ποσοστό διαμολυσθέντων κυττάρων	66.6%	68.6%
HeLa	Μάρτυρας	0.4%	0.4%
	EGFP-N1	38%	35%
	Ποσοστό διαμολυσθέντων κυττάρων	37.6%	34.6%
A549	Μάρτυρας	0.4%	0.4%

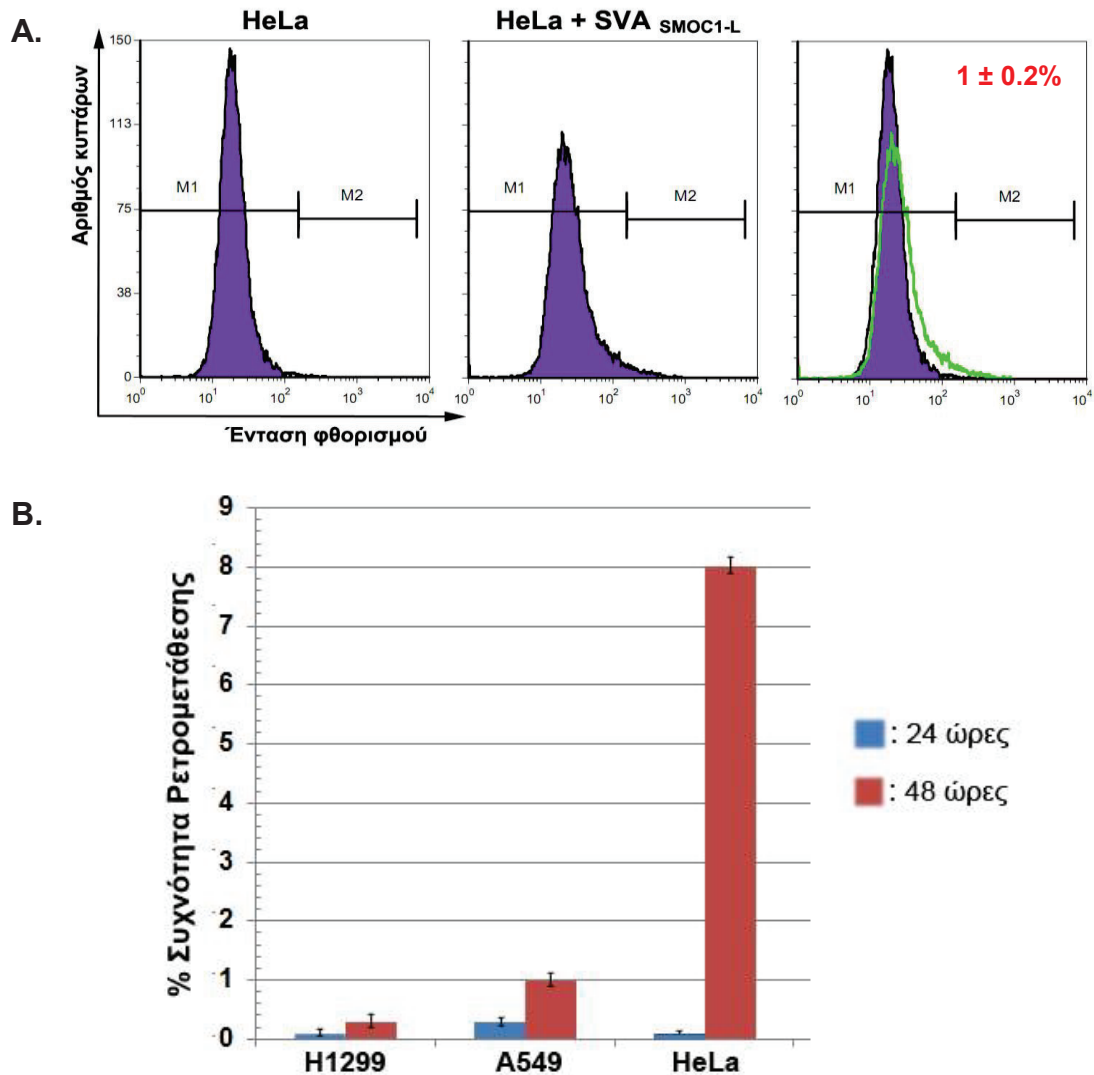
	EGFP-N1	27.6%	29%
	Ποσοστό διαμολυσθέντων κυττάρων	27.2%	28.6%
Jurkat	Μάρτυρας	0.4%	0.4%
	EGFP-N1	18%	60%
	Ποσοστό διαμολυσθέντων κυττάρων	17.6%	59.4%
Jurkat - Bcl2	Μάρτυρας	0.4%	0.4%
	EGFP-N1	15.8%	44%
	Ποσοστό διαμολυσθέντων κυττάρων	15.4%	43.6%
HUT-78	Μάρτυρας	0.4%	0.4%
	EGFP-N1	6%	29.1%
	Ποσοστό διαμολυσθέντων κυττάρων	5.4%	28.7%

Πίνακας 3.3: Ποσοστά διαμολυσθέντων κυττάρων ανά κυτταρική σειρά. Τα τελικά ποσοστά προκύπτουν από αφαίρεση της τιμής αυτο-φθορισμού των κυττάρων-μάρτυρα από τα διαμολυσθέντα.

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.3, η απόδοση των συνθηκών διαμόλυνσης ήταν ικανοποιητική σε όλες τις κυτταρικές σειρές οπότε χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες ακολούθησε διαμόλυνση με το πλασμίδιο SVAS_{MOC1-L}/EGFP-INT.

3.4.2 Διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων τραχήλου μητρας (HeLa) και επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (A549, H1299)

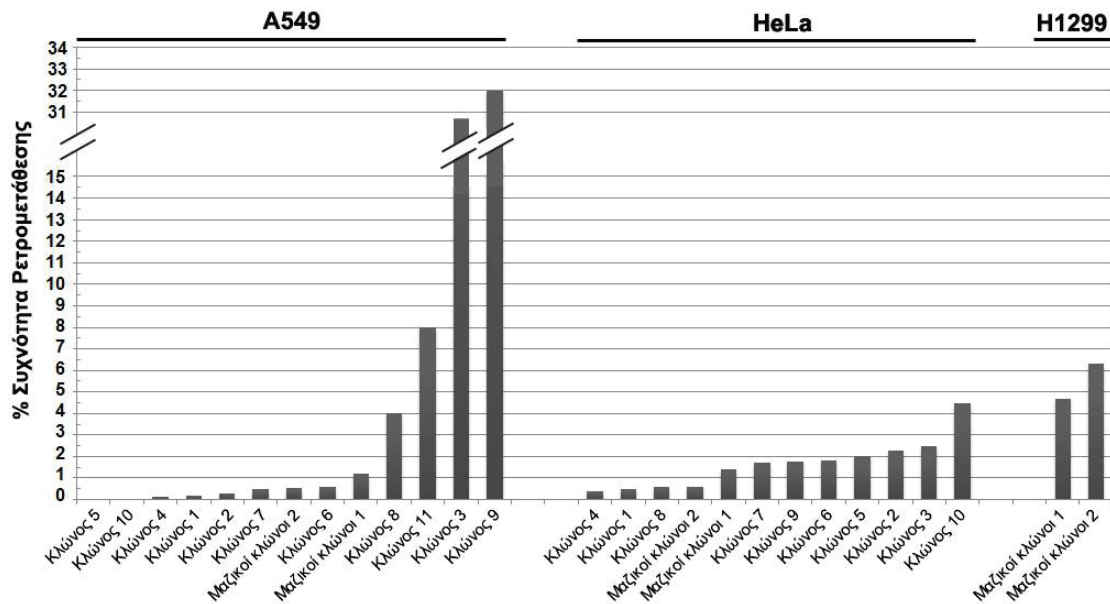
Για να εξετάσουμε το δυναμικό ρετρομετάθεσης του SVAS_{MOC1-L} κύτταρα από τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, A549 και H1299 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο SVAS_{MOC1-L}/EGFP-INT. Σε πρώτο στάδιο έγινε μέτρηση των θετικών σε γεγονόςτα ρετρομετάθεσης κυττάρων στις 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Στην *Εικ. 3.14* αναλύεται ο τρόπος μέτρησης ενώ στο γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και για τις τρεις κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 3.14: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης του $SVA_{SMOC1-L}$ έπειτα από έκτοπη έκφραση του για 24 και 48 ώρες. **A.** Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική κατανομή φθορισμού κυττάρων μάρτυρα (α), διαμολυσμένων κυττάρων (β) καθώς και η επικάλυψη τους (γ: μωβ κατανομή= μάρτυρας, πράσινη κατανομή= δείγμα), όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση FACS. Ο πληθυσμός που αναλύθηκε ήταν 15.000 κύτταρα, ο αυτοφθορισμός του μάρτυρα τέθηκε στο 99.60% επί του συνόλου των κυττάρων (όριο φθορισμού M1), ενώ θεωρήθηκαν ως λανθασμένα-θετικά κύτταρα το 0.40% (όριο φθορισμού M2), πέραν του οποίου υπολογίστηκαν οι συχνότητες ρετρομετάθεσης ως EGFP-θετικά κύτταρα. **B.** Το $SVA_{SMOC1-L}$ διαμολύνθηκε σε 200.000 κύτταρα H1299, A549 και HeLa και ακολούθησε μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσής του στις 24 και 48 ώρες.

Το υπόλοιπο μέρος των διαμολυσθέντων κυττάρων μετά από 48 ώρες επιλέχθηκε με χρήση του αντιβιοτικού Υγρομυκίνη Β για 18 ημέρες. Μετά το πέρας της επιλογής από τους συνολικούς ανθεκτικούς κλώνους απομονώθηκαν σε κάθε περίπτωση ένας αριθμός από μονήρεις, ενώ οι υπόλοιποι θρυψινοποιήθηκαν και

αναπτύχθηκαν ως μαζικοί κλώνοι. Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς H1299 η απομόνωση μονήρων κλώνων δεν ήταν εφικτή λόγω του αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για το λόγο αυτό τα δείγματα αποτέλεσαν δύο περιπτώσεις μαζικών κλώνων στους οποίους μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης. Σε όλες τις περιπτώσεις μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης σε μονήρεις και μαζικούς κλώνους, με μάρτυρα μη διαμολυσμένα κύτταρα όπως παρουσιάζεται στην *Εικ. 3.15*.

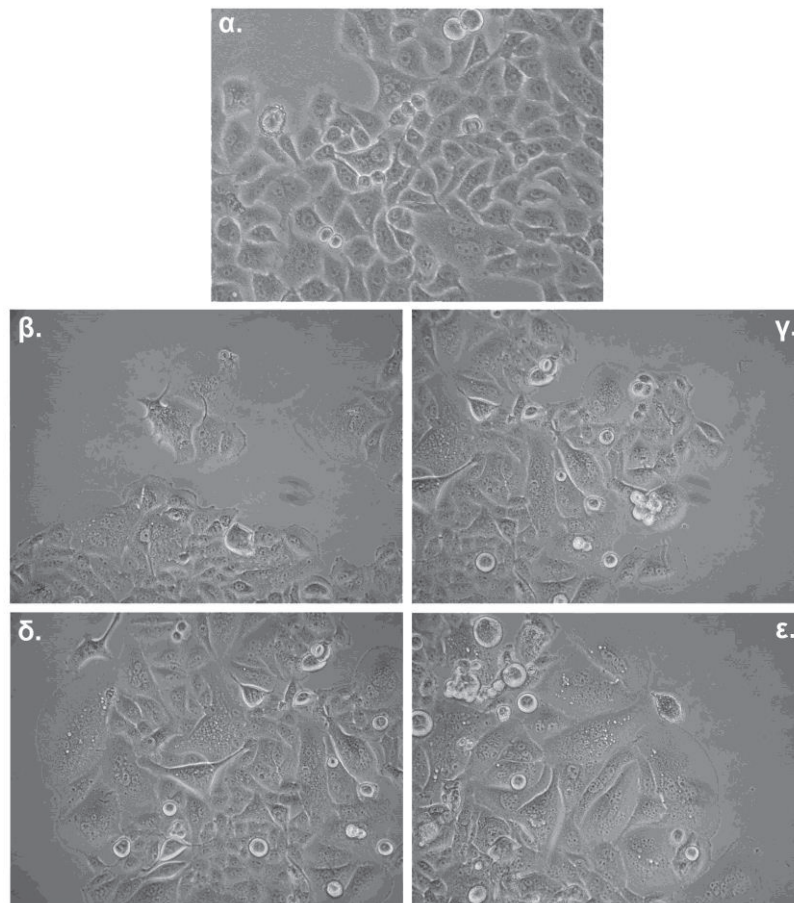


Εικόνα 3.15: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης $SVASMOCI-L$ σε μονήρεις και μαζικούς κλώνους κυττάρων. Κλώνοι κυττάρων που φέρουν το $SVASMOCI-L$ καλλιεργήθηκαν απουσία αντιβιοτικού για 3 ημέρες και τα ποσοστά ρετρομετάθεσης μετρήθηκαν με μάρτυρα μη διαμολυσμένα κύτταρα σε κάθε περίπτωση.

Όσο αφορά την κυτταρική σειρά HeLa σε όλους τους κλώνους ανιχνεύτηκαν γεγονότα ρετρομετάθεσης: σε τρεις μονήρεις και σε έναν εκ των μαζικών, τα ποσοστά που ανιχνεύθηκαν ήταν χαμηλά, της τάξεως του 0.5%. Σε έξι μονήρεις και σε έναν μαζικό τα ποσοστά κυμάνθηκαν από 1.5 - 2.8% ενώ σε έναν μονήρη κλώνο μετρήθηκε συχνότητα της τάξεως του 4.8%. Στην κυτταρική σειρά A549 τα ποσοστά των μαζικών και 7 μονήρων κλώνων μετρήθηκαν από 0-1.2%, οι κλώνοι 8 και 11 είχαν ποσοστά 4- και 8% αντίστοιχα ενώ δύο εκ των κλώνων, οι 3 και 10 εμφάνισαν εξαιρετικά υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης της τάξης του 30.8- και 32%. Τέλος, και οι δυο μαζικοί κλώνοι των κυττάρων H1299 εμφάνισαν ποσοστά ρετρομετάθεσης 4.7% και 6.3%.

3.4.3 Ρετρομεταθετικά γεγονότα σε κύτταρα HeLa

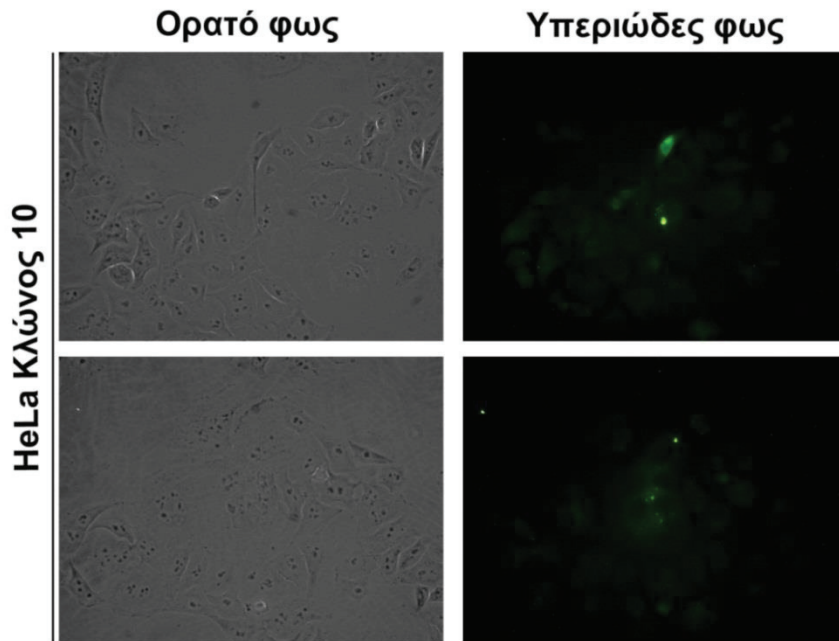
Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως τα κύτταρα των κλώνων που έφεραν το $SVA_{SMOC1-L}/EGFP-INT$ εμφάνιζαν διαφορετική μορφολογία σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα στην κυτταρική σειρά HeLa. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν κύτταρα αυξημένα σε μέγεθος, τα οποία σε μεγάλο ποσοστό ήταν πολυπύρηννα. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά εμφάνιζαν εκτεταμένα φυλλοπόδια και αυξημένη κοκκίωση στο κυτταρόπλασμα τους. Στην *Εικ. 3.16* απεικονίζονται κύτταρα εντός της φλάσκας έπειτα από παρατήρηση και φωτογράφιση σε οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 3.16: Μορφολογία κυττάρων HeLa θετικών ρετρομετάθεσης $SVA_{SMOC1-L}$. Κύτταρα μάρτυρα HeLa καθώς και του κλώνου 3, φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse TS 100 σε φακό 20x. Οι εικόνες **β** και **γ**, **δ** και **ε** αντιστοιχούν σε κύτταρα του κλώνου 3 που φέρουν το $SVA_{SMOC1-L}/EGFP-INT$ ενώ η εικόνα **α** σε αμεταχειρίστη κύτταρα μάρτυρα HeLa.

Προκειμένου να ανιχνευθούν με μικροσκοπία κύτταρα θετικά σε ρετρομετάθεση, κύτταρα από μαζικές και μονήρεις καλλιέργειες κλώνων αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στους μισούς κλώνους ανιχνεύθηκαν γεγονότα

ρετρομετάθεσης ως πράσινα/EGFP-θετικά κύτταρα τα οποία ήταν εντονότερα και φωτογραφήθηκαν για τον κλώνο 10, που παρουσιάζεται στην *Εικ. 3.17*.



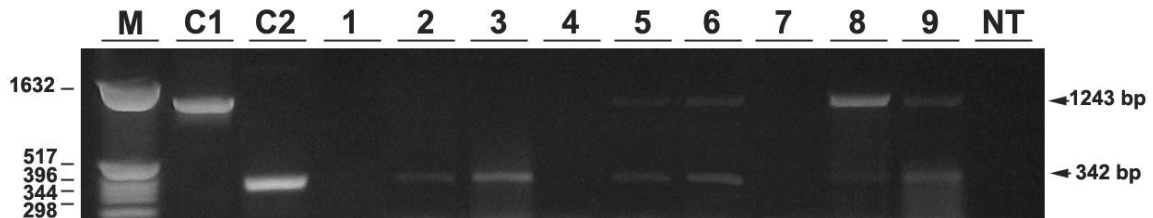
Εικόνα 3.17: Ανίχνευση EGFP-θετικών κυττάρων σε κύτταρα HeLa του κλώνου 3 που φέρουν το $SVAS_{SMOC1-L}/EGFP-INT$. Κύτταρα μαζικών και μονήρων κλώνων αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν με 3.8% παραφορμαλδεΐδη και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού για την ανίχνευση κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση που εκφράζουν EGFP.

Κατά συνέπεια, η διαμόλυνση του ανασυνδυασμένου $SVAS_{SMOC1-L}$ σε κύτταρα HeLa παράγει γεγονότα ρετρομετάθεσης, που συνοδεύονται από σημαντικές φαινοτυπικές αλλαγές και ανιχνεύονται παρουσία της EGFP σε μικροσκόπιο φθορισμού.

3.4.4 Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω PCR

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω γεγονότα ρετρομετάθεσης $SVAS_{SMOC1-L}$ σε επίπεδο ενσωματώσεων στο DNA, απομονώθηκαν εκχυλίσματα DNA από κύτταρα μάρτυρα HeLa, A549 και H1299 καθώς και κύτταρα καλλιιεργειών μαζικών και μονήρων κλώνων. Ακολούθησε ανάλυση PCR με εκκινητές για το γονίδιο της EGFP ακολουθώντας την εξής λογική: οι εκκινητές υβριδοποιούνται ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου της EGFP, δίνοντας ένα προϊόν PCR μεγέθους 1243 bp, που περιλαμβάνει την αλληλουχία του ιντρονίου της β-σφαιρίνης. Όταν συμβούν γεγονότα ρετρομετάθεσης, η αποκοπή του ιντρονίου θα παράξει ένα μικρότερο

προϊόν μεγέθους 342 bp. Όπως παρατηρούμε, σε DNA κυττάρων διαμολυσμένων με το *SVASMOCI-L*, πέραν της δέσμης των 1243 bp (μη ματισμένο γονίδιο EGFP), ανιχνεύεται και η δέσμη στα 342 bp που πιστοποιεί γεγονότα ρετρομετάθεσης (ματισμένο γονίδιο EGFP). Αντιθέτως, στα κύτταρα μάρτυρα δεν ανιχνεύεται προϊόν σε καμία διαδρομή (Εικ. 3.18).



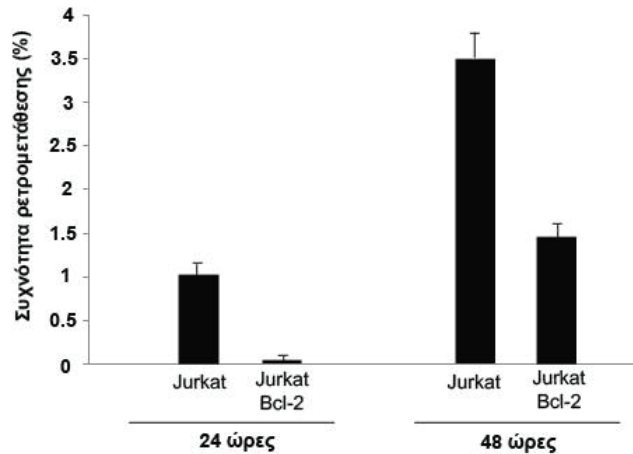
Εικόνα 3.18: Ανάλυση PCR προς ταυτοποίηση ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων με εκκινητές για το γονίδιο της EGFP. Οι διαδρομές 1, 4 και 7 αντιστοιχούν σε κύτταρα μάρτυρα HeLa, A549 και H1299, αντίστοιχα. Οι διαδρομές 2 και 3 αντιστοιχούν στους κλώνους 3 και 10 κυττάρων HeLa, οι 5 και 6 στον κλώνο 9 και σε μαζικούς κλώνους κυττάρων A549 και οι 8 και 9 στους δύο μαζικούς κλώνους H1299. Οι διαδρομές C1 και C2 αντιστοιχούν σε αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πλασμίδια pNVL3/EGFP-INT και pEGFP-N1 και αναλογούν σε μάρτυρες μη ματισμένου και ματισμένου γονιδίου της EGFP αντίστοιχα. Η διαδρομή NT αντιστοιχεί σε αντίδραση χωρίς DNA.

Συνεπώς τα γεγονότα ρετρομετάθεσης που ανιχνεύθηκαν με FACS επιβεβαιώνονται και μοριακά μέσω PCR με την παρουσία της ζώνης των 342bp.

3.5 Ρετρομεταθετικά γεγονότα *SVASMOCI-L* σε λευχαιμικά κύτταρα

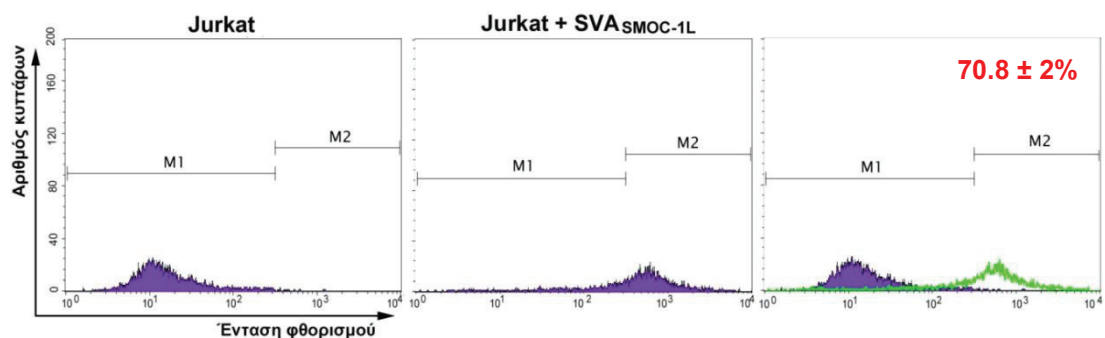
3.5.1 Διαμόλυνση σε λευχαιμικά T-λεμφοκύτταρα Jurkat

Δεδομένου ότι το τρανσποζόνιο *SVASMOCI-L* απομονώθηκε από λευχαιμικά κύτταρα, θελήσαμε να ελέγξουμε τη ρετρομεταθετική του ικανότητα σε ανάλογη κυτταρική σειρά. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα Jurkat και Jurkat Bcl-2 (που εκφράζουν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2), διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο *SVASMOCI-L/EGFP-INT* και αρχικά, η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε μεταπτωτικά, σε ένα μέρος των κυττάρων, στις 24 και 48 ώρες. Στις 24 ώρες δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σημαντικό ποσοστό στα κύτταρα Jurkat-Bcl2 ενώ έφθασε το 1% στα Jurkat. Αντίθετα, στις 48 ώρες μετρήθηκε ένα ποσοστό ρετρομετάθεσης 1.6% στα Jurkat-Bcl2 και 3.6% στα Jurkat (Εικ.3.19).



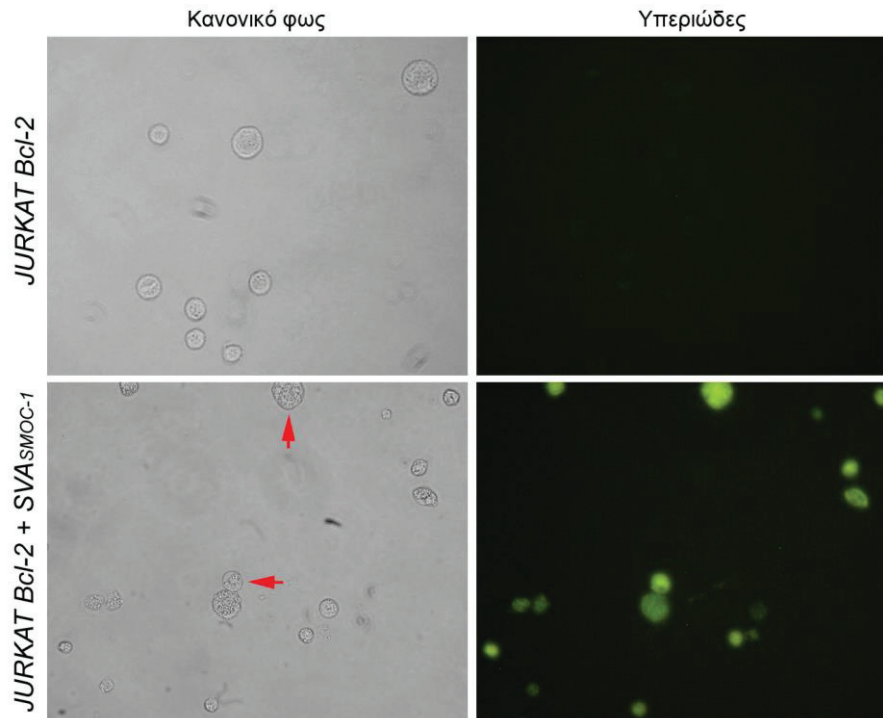
Εικόνα 3.19: Μεταπτωτική μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης του SVA σε κύτταρα Jurkat και Jurkat Bcl-2. Η συχνότητα ρετρομετάθεσης SVA μετρήθηκε με FACS σε κύτταρα Jurkat και Jurkat Bcl-2 σε 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνσή τους. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση τα αντίστοιχα μη διαμολυσμένα κύτταρα.

Το υπόλοιπο μέρος των διαμολυσθέντων κυττάρων μετά από 48 ώρες επιλέχθηκε με 70 μg/ml του αντιβιοτικού Υδρομυκίνη Β για 18 ημέρες. Παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα εμφάνιζαν μεγάλο ποσοστό κυτταρικού θανάτου τόσο λόγω της αντιβιοτικής πίεσης όσο και της μεταλλαξιγόνου φύσης του ρετροτρανσποζονίου. Τα κύτταρα Jurkat δεν επιβίωσαν της επιλογής ενώ, αντίθετα, στα Jurkat Bcl-2 απομονώθηκαν μαζικοί κλώνοι. Ωστόσο τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν με ιδιαίτερα χαμηλό ρυθμό δημιουργώντας δυσκολίες στη μελέτη τους. Με ανάλυση FACS σε 3000 κύτταρα Jurkat Bcl-2/SVA_{SMOC1-L} και σε αντίστοιχο αριθμό κυττάρων μάρτυρα βρέθηκε ποσοστό συχνότητας ρετρομετάθεσης 70.8%. (Εικ. 3.20).



Εικόνα 3.20: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOC1-L} σε κύτταρα Jurkat Bcl-2. Η συχνότητα ρετρομετάθεσης SVA μετρήθηκε με FACS έπειτα από αντιβιοτική επιλογή και μακρόχρονη ανάνηψη 3 μηνών.

Προκειμένου να ανιχνευθούν με μικροσκοπία UV γεγονότα ρετρομετάθεσης, κύτταρα Jurkat-Bcl2 τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εικ. 3.21). Η μικροσκοπική ανάλυση αποκάλυψε κύτταρα θετικά ρετρομετάθεσης που έφεραν πυκνωτικό πυρήνα.



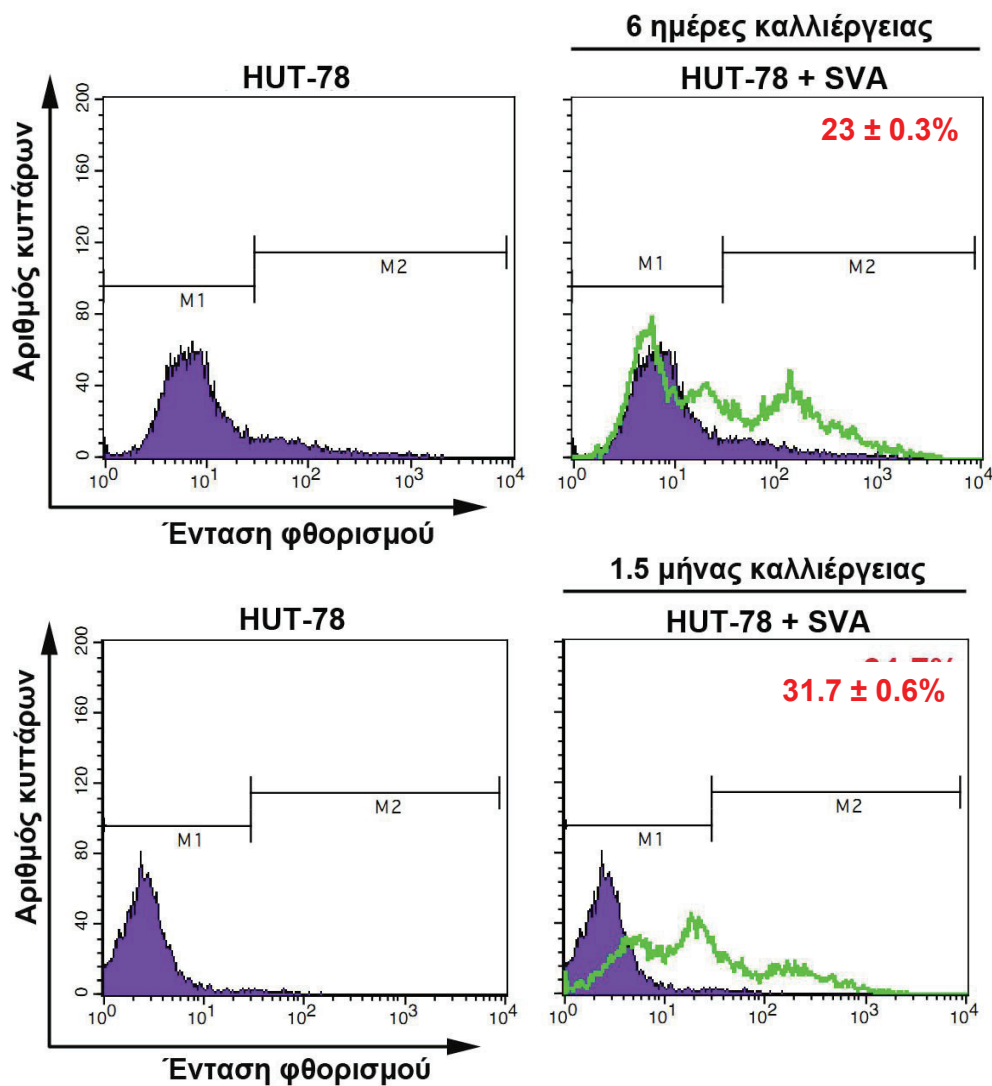
Εικόνα 3.21: Ανίχνευση EGFP-θετικών κυττάρων σε κύτταρα Jurkat Bcl-2 που φέρουν το $SVA_{SMOC1-L}/EGFP-INT$. Κύτταρα Jurkat Bcl-2 φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού για την ανίχνευση κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση που εκφράζουν EGFP. Με βέλη υποδεικνύονται οι πυκνωτικοί πυρήνες.

Συμπερασματικά, σε T-λεμφοκύτταρα Jurkat, συμβαίνουν γεγονότα ρετρομετάθεσης $SVA_{SMOC1-L}$ που φαίνεται να σχετίζονται με φαινόμενα επαγωγής πυκνωτικού πυρήνα.

3.5.2 Διαμόλυνση σε λευχαιμικά T-λεμφοκύτταρα HUT-78

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε και μια δεύτερη λευχαιμική κυτταρική σειρά, τα HUT-78 ώστε να ελέγξουμε τη ρετρομεταθετική ικανότητα του $SVA_{SMOC1-L}$. Η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε αρχικά στις 6 ημέρες καλλιέργειας, λόγω του ποσοστού νεκρών κυττάρων που παρατηρήθηκαν στις πρώτες ημέρες καλλιέργειας. Το ποσοστό των θετικών EGFP-κυττάρων που βρέθηκε ήταν 23% (Εικ. 3.22). Το υπόλοιπο μέρος των διαμολυσθέντων κυττάρων μετά από τις 6 ημέρες επιλέχθηκε με

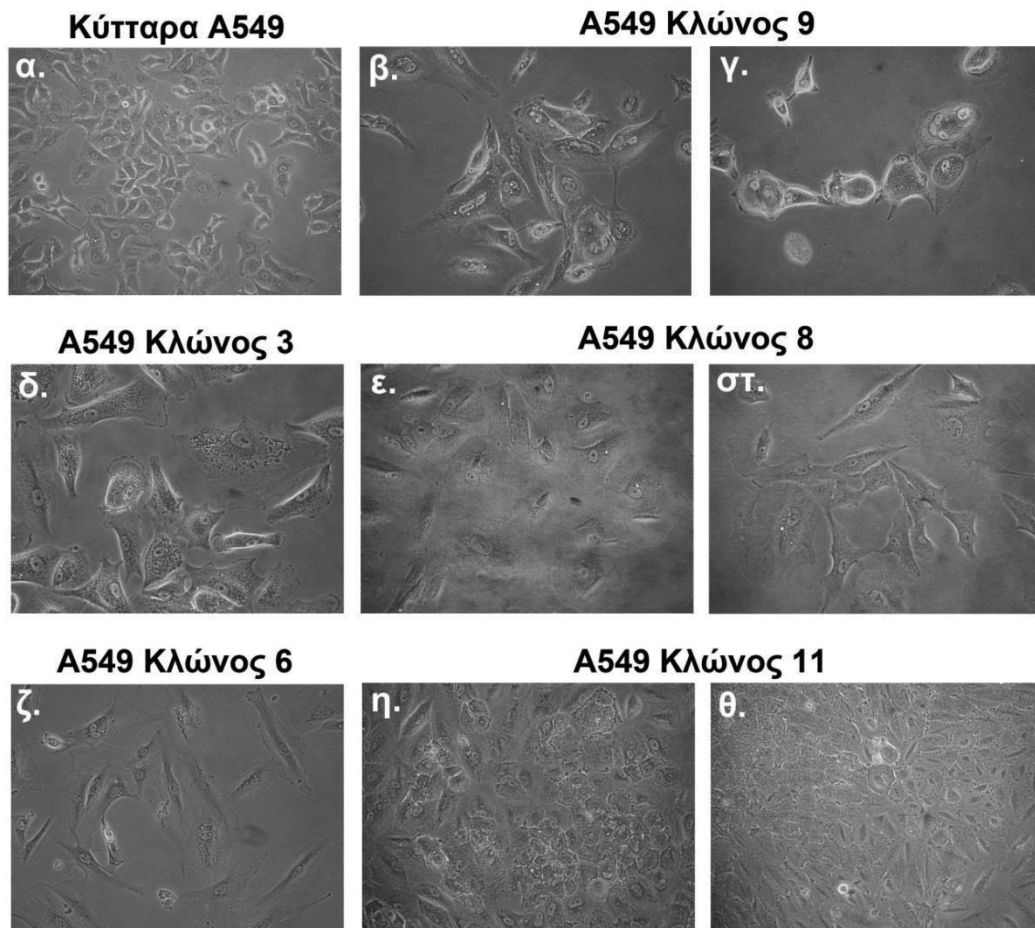
100-150 $\mu\text{g/ml}$ του αντιβιοτικού Υγρομυκίνη Β για 14 ημέρες. Και σε αυτή την περίπτωση όπως και στα Jurkat, τα κύτταρα εμφάνισαν μεγάλο ποσοστό κυτταρικού θανάτου τόσο λόγω της αντιβιοτικής πίεσης. Λόγω του ότι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν με ιδιαίτερα χαμηλό ρυθμό έγινε δυνατή η μέτρησή τους με FACS έπειτα από μακρόχρονη ανάνηψη 25 ημερών. Ανάλυση κυττάρων HUT-78 και HUT-78/*SVA_{SMOC1-L}* σε αντίστοιχο αριθμό κυττάρων μάρτυρα βρέθηκε ποσοστό συχνότητας ρετρομετάθεσης 31.7% (Εικ. 3.22).



Εικόνα 3.22: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης του *SVA_{SMOC1-L}* σε κύτταρα HUT-78. Η συχνότητα ρετρομετάθεσης *SVA* μετρήθηκε με FACS έπειτα: **A.** από 6 ημέρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση και **B.** από αντιβιοτική επιλογή 14 ημερών και μακρόχρονη ανάνηψη 25 ημερών.

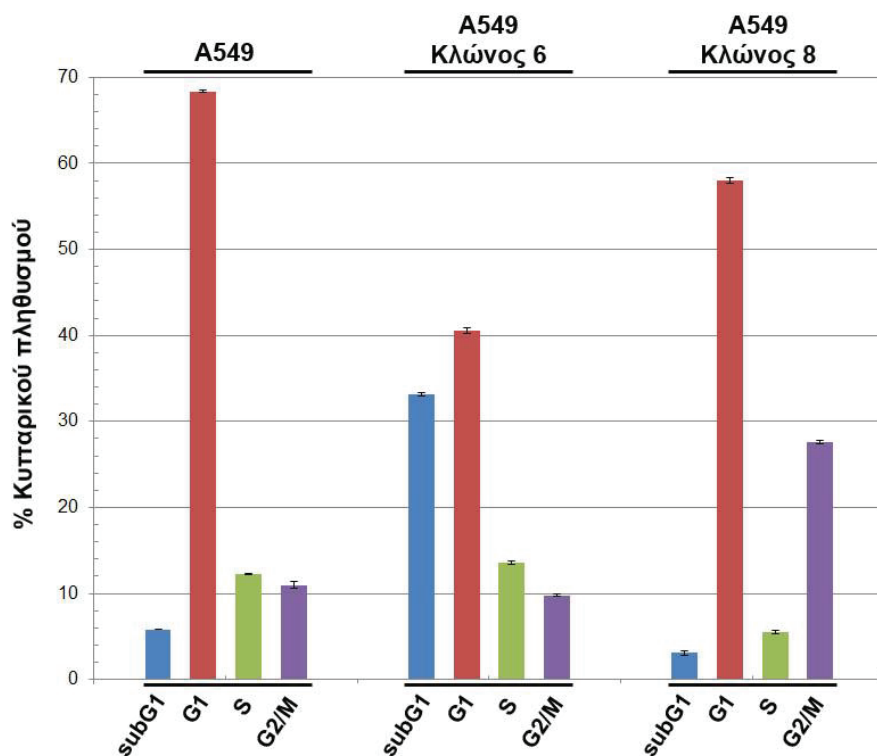
3.6 Ρετρομεταθετικά γεγονότα σε κύτταρα A549

Κατ' αναλογία με την αλλαγή μορφολογίας που παρατηρήσαμε σε κύτταρα HeLa (βλ. Ενότητα 3.4.3), φαινοτυπικές αλλαγές παρατηρήθηκαν και στην κυτταρική σειρά A549. Στους κλώνους που εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά ρετρομετάθεσης (κλώνοι 3, 6, 8, 9 και 11), τα κύτταρα παρουσίαζαν ιδιόζουσα μορφολογία συγκρινόμενα με τα κύτταρα μάρτυρα A549. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε εμφανής διόγκωση του κυτταροπλάσματος (Εικ. 3.23 β, γ, στ, ζ) με έντονη κοκκίωση (Εικ. 3.23 δ, ε), αυξημένο μέγεθος και εκτεταμένα φυλλοπόδια. Επίσης μεγάλο ποσοστό των κυττάρων παρουσίασαν φαινόμενα πολυτυρήνωσης.



Εικόνα 3.23: Μορφολογία κυττάρων A549 θετικών ρετρομετάθεσης SVAs_{SMOCL}. Κύτταρα μάρτυρα A549 (α) καθώς και των κλώνων 3 (δ), 6 (ζ), 8 (δ, ε), 9 (β, γ) και 11 (η, θ) φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse TS 100. Όλες οι εικόνες έχουν ληφθεί στο ίδιο οπτικό ζουμ, σε μεγέθυνση 20x. \

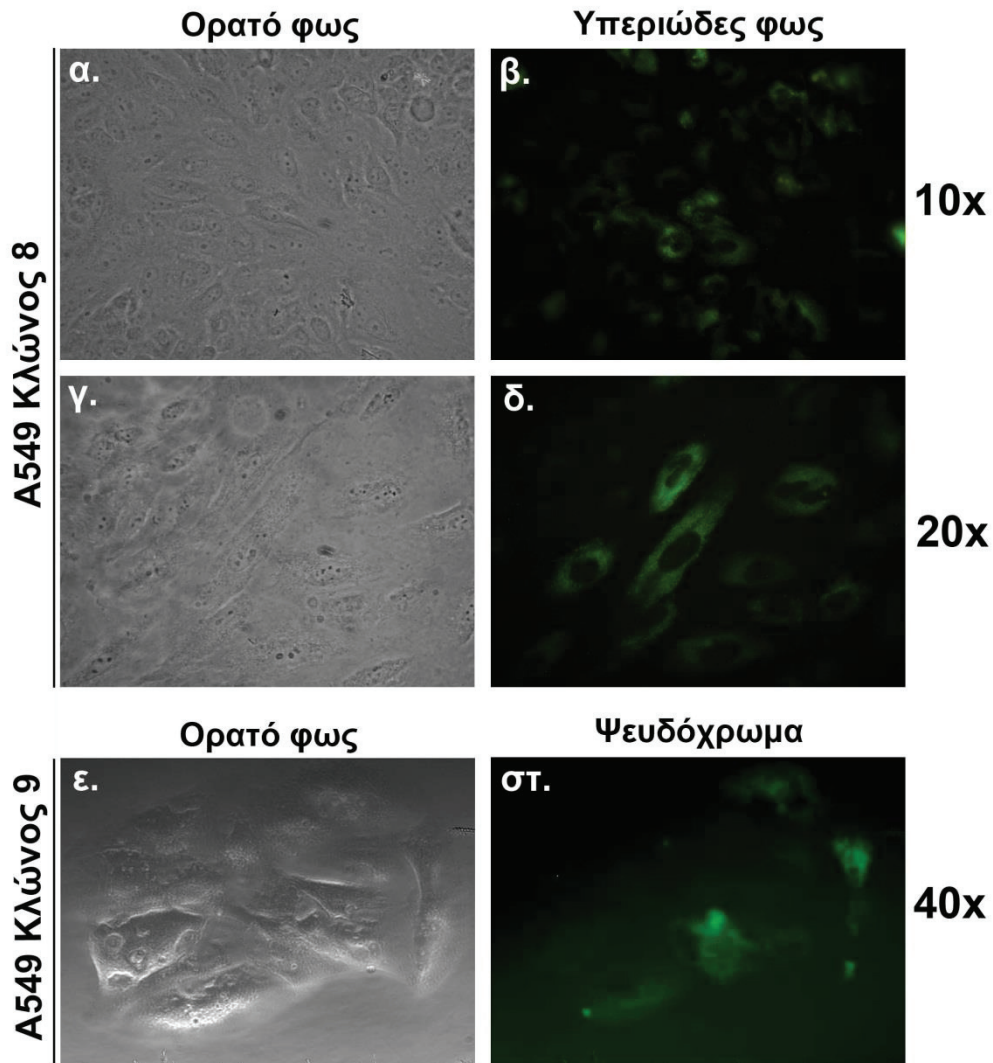
Παρατηρήσαμε πως τα κύτταρα των κλώνων με υψηλή ρετρομετάθεση αναπτύσσονται αργά έχοντας πολύ χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Για να διερευνήσουμε αν τα φαινόμενα αυτά συνδέονται με την επίδραση της ρετρομετάθεσης στην ομαλότητα του κυτταρικού τους κύκλου, περίπου 15.000 κύτταρα από κάθε κλώνο αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής έπειτα από χρώση του DNA τους με Ιωδιούχο Προπιδίο (PI). Όπως φαίνεται στην *Εικ. 3.24* στον κλώνο 6 εμφανίζεται ποσοστό υποδιπλοειδών κυττάρων 33% επί του συνόλου του κυτταρικού πληθυσμού ενώ στα A549 το αντίστοιχο ποσοστό είναι 5.8%. Στον κλώνο 8 το 27.3% των κυττάρων βρίσκονται στη φάση G2/M σε σύγκριση με τα A549 όπου η αντίστοιχη τιμή είναι 11.7%.



Εικόνα 3.24: Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου κυττάρων A549 θετικών ρετρομετάθεσης *SVASMOC-1L*. Κύτταρα μάρτυρα A549, A549 κλώνου 6 και Κλώνου 8 επωάστηκαν με 50 $\mu\text{g/ml}$ Ιωδιούχου Προπιδίου (PI) και έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. SubG1: υποδιπλοειδή κύτταρα. (ανεξάρτητες μετρήσεις $n=2$).

Στη συνέχεια, για να ανιχνεύσουμε και μικροσκοπικά την ύπαρξη EGFP, κύτταρα κλώνων με υψηλή ρετρομετάθεση αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στην περίπτωση των κλώνων 3 και 9, η ανάπτυξή τους σε καλυπτρίδες και η μονιμοποίησή τους δεν

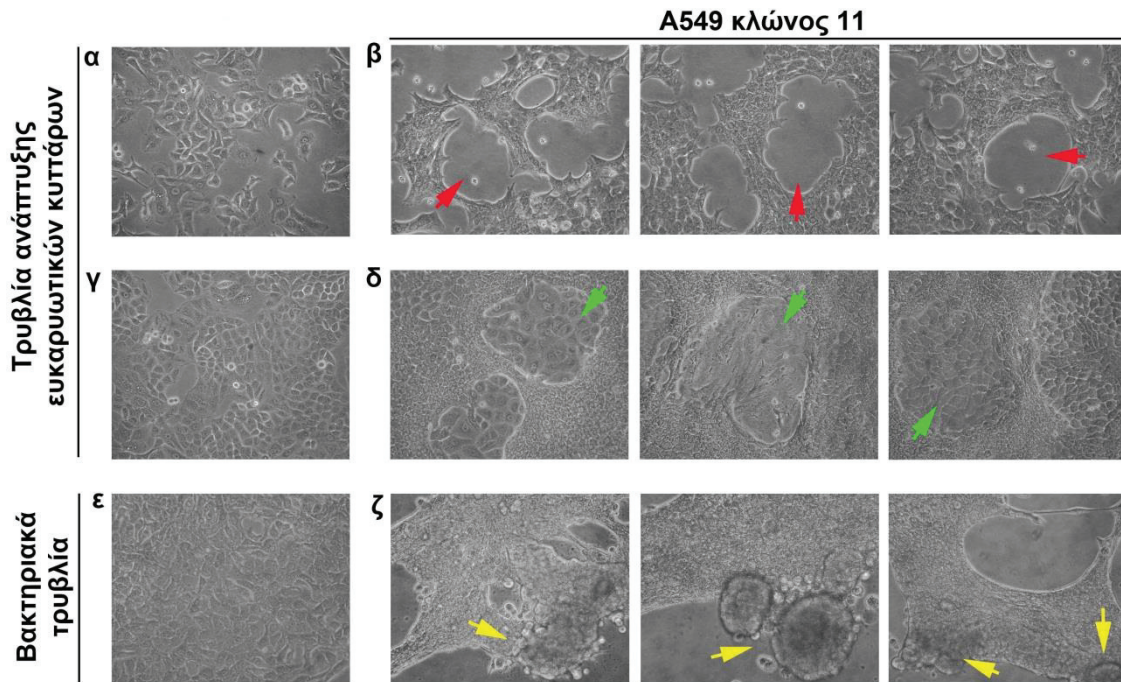
ήταν εφικτή καθώς τα κύτταρα ήταν πολύ ευαίσθητα σε μεταχείριση με θρυψίνη. Για το λόγο αυτό τα γεγονότα ρετρομετάθεσης ανιχνεύτηκαν ως φθορισμός στο υπεριώδες φως έπειτα από παρατήρηση των κυττάρων εντός της φλάσκας σε μικροσκόπιο φθορισμού *Leica DM IBRE*. Παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία για τον κλώνο 9 (Εικ. 3.25).



Εικόνα 3.25: Ανίχνευση EGFP-θετικών κυττάρων σε κλώνους A549 που φέρουν το *SVAS_{SMOC1-1}/EGFP-INT*. α-δ: Κύτταρα A549 του κλώνου 8 αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν με 3.8% παραφορμαλδεΰδη και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού για την ανίχνευση κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση που εκφράζουν EGFP. ε, στ: Ζωντανά, μη μονιμοποιημένα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο *Leica DM IBRE* και φωτογραφήθηκαν με κάμερα HRD060-NIK CCD στο ορατό και υπεριώδες φως. Η φωτογραφία στ. έχει υποστεί ειδική επεξεργασία του σήματος για πράσινο χρώμα.

3.6.1 Η περίπτωση ενός κλώνου A549 με υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης

Τα κύτταρα του κλώνου 11, έπειτα από καλλιέργεια 30 ημερών άρχισαν να σχηματίζουν δομές εντός της φλάσκας οι οποίες ομοιάζαν με κυψελίδες πνεύμονα. Τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και ένα ποσοστό αυτών μεταφέρθηκε σε βακτηριακό τρυβλίο, σε συνθήκες χαμηλής προσκόλλησης όπου και σημειώθηκε ο σχηματισμός παρόμοιων δομών.

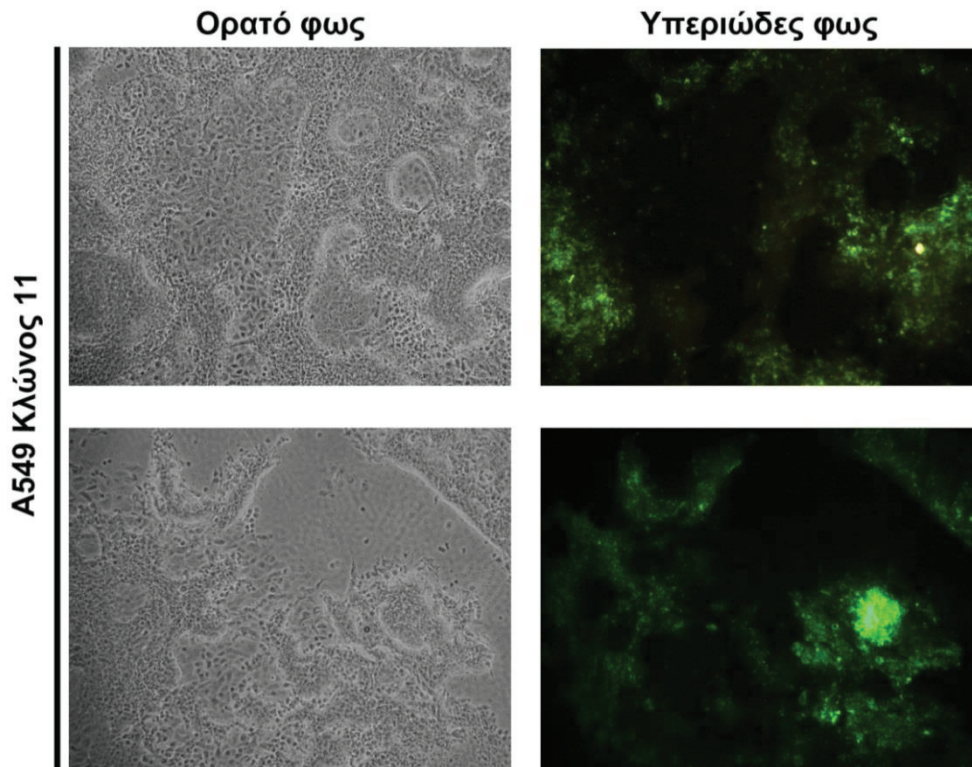


Εικόνα 3.26: Μορφολογία κυττάρων κλώνου 11 A549 θετικά σε ρετρομετάθεση $SVASMOC-11$. Κύτταρα A549 και κλώνου 11 A549 αναπτύχθηκαν τόσο σε συνθήκες κανονικής όσο και σε συνθήκες χαμηλής προσκόλλησης. Οι φωτογραφίες α και β αντιστοιχούν σε χαμηλή κυτταρική πυκνότητα κυττάρων μάρτυρα και κλώνου ενώ οι γ και δ σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα κυττάρων μάρτυρα και κλώνου αντίστοιχα. Στις φωτογραφίες ε και ζ φαίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων σε βακτηριακά τρυβλία. Τα βέλη χρώματος: κόκκινο, πράσινο και κίτρινο υποδεικνύουν χαρακτηριστικές κυκλικές δομές, απώλεια επιθηλιακού φαινοτύπου και δημιουργία σφαιρών, αντίστοιχα.

Όπως παρατηρούμε στην Εικ. 3.26, σε συνθήκες κανονικής προσκόλλησης και χαμηλής πυκνότητας τα κύτταρα αναπτύσσονται δημιουργώντας κυκλικές δομές εντός των οποίων δεν παρατηρείται κυτταρική ανάπτυξη. Μετά από 10 μέρες καλλιέργειας, οι ίδιες δομές οριοθετούνται από κύτταρα με ιδιαίτερα στενές διακυτταρικές συνδέσεις και εσωτερικά αυτών υπάρχουν κύτταρα που σε ορισμένες περιπτώσεις χάνουν τον κλασσικό επιθηλιακό τους φαινότυπο και γίνονται πιο

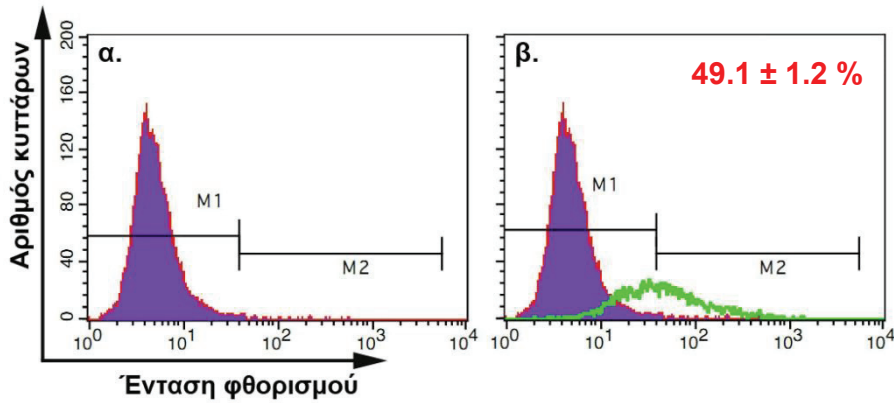
πεπλατυσμένα. Στην περίπτωση συνθηκών χαμηλής προσκόλλησης, τα κύτταρα σχηματίζουν εστίες που ομοιάζουν με σφαίρες μη διαφοροποιημένων κυττάρων.

Οι σφαίρες που σχηματίστηκαν στα βακτηριακά τρυβλία μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού για την παρουσία θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων. Τα εναπομείναντα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν ώστε να γίνουν μονήρη και μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσής τους με FACS.



Εικόνα 3.27: Ανίχνευση EGFP-θετικών κυττάρων σε κύτταρα A549 του κλώνου 11: Κύτταρα A549 κλώνου 11 αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν με 3.8% παραφορμαλδεΰδη και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

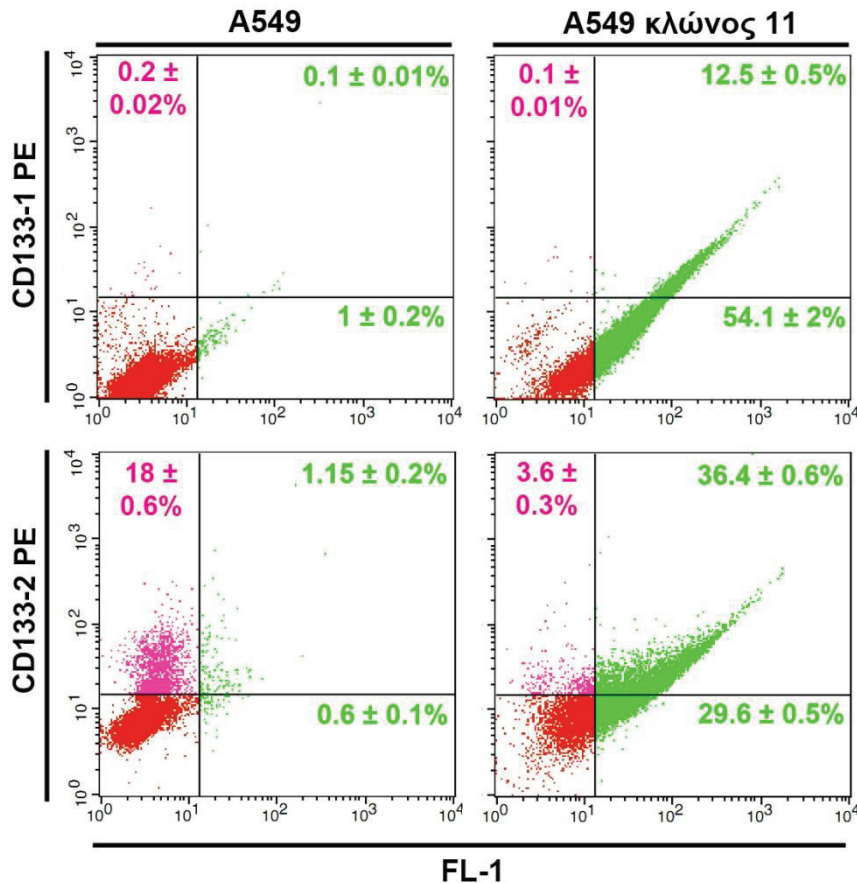
Παρατηρήθηκε ότι πράσινα κύτταρα θετικά σε ρετρομετάθεση, ανιχνεύονται στα σημεία όπου τα κύτταρα εμφανίζουν στενές διακυτταρικές συνδέσεις ενώ ο φθορισμός είναι εντονότερος στην περιοχή που σχηματίζονται οι σφαίρες (Εικ. 3.27). Η εικόνα αυτή συνάδει με το αποτέλεσμα της κυτταρομετρίας ροής όπου μετράται η υψηλότερη συχνότητα ρετρομετάθεσης που έχει ανιχνευτεί σε κλώνο, της τάξης του 49.1% (Εικ. 3.28).



Εικόνα 3.28: Το *SVASMOCI-L* ρετρομετατίθεται σε υψηλή συχνότητα σε κύτταρα A549 του Κλώνου 11. Παρουσιάζονται οι κατανομές φθορισμού κυττάρων μάρτυρα (α), διαμολυσμένων κυττάρων καθώς και η επικάλυψη τους (β) (μωβ κατανομή= μάρτυρας, πράσινη κατανομή= δείγμα), όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση FACS. Ο πληθυσμός που αναλύθηκε ήταν 15.000 κύτταρα, ο αυτοφθορισμός του μάρτυρα τέθηκε στο 99.60% επί του συνόλου των κυττάρων (όριο φθορισμού M1), ενώ θεωρήθηκαν ως λανθασμένα-θετικά κύτταρα το 0.40% (όριο φθορισμού M2), πέραν του οποίου υπολογίστηκαν οι συχνότητες ρετρομετάθεσης ως EGFP-θετικά κύτταρα.

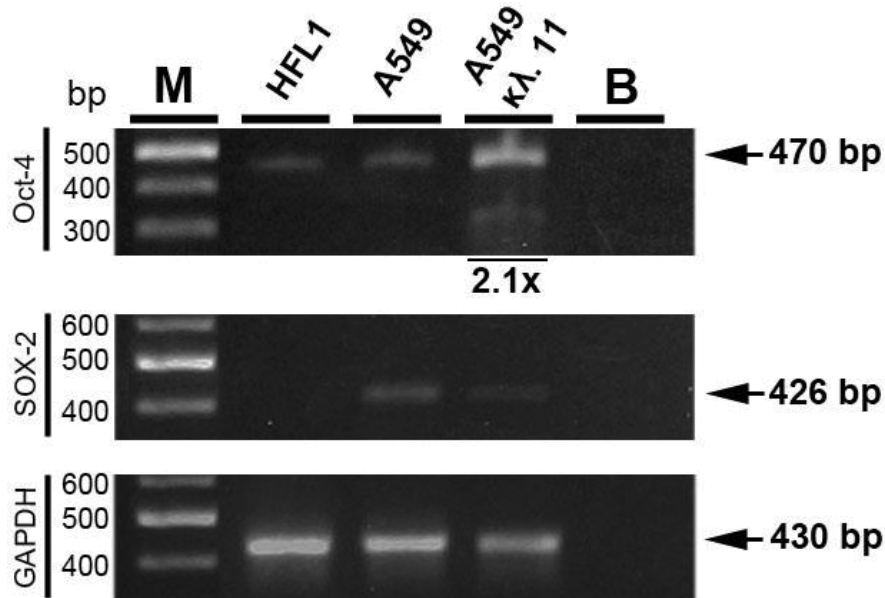
Είναι γνωστό πως οι μακροχρόνιες καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων πνεύμονα που σχηματίζουν σφαίρες και αυξάνουν σε μέγεθος, εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τον αντιγονικό δείκτη CD133, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που περιγράφεται ως δείκτης καρκινικών βλαστικών κυττάρων και έχουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης. Για το λόγο αυτό, κύτταρα μάρτυρα A549 καθώς και κλώνου 11 ελέχθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής με αντισώματα που αναγνωρίζουν τους επιτόπους 1 και 2 της πρωτεΐνης CD133.

Όπως προκύπτει από την *Εικ. 3.29* τα κύτταρα του μάρτυρα δεν εκφράζουν το CD133-1 ενώ τα κύτταρα του κλώνου 11 το εκφράζουν σε ποσοστό 12.5% και είναι ταυτόχρονα θετικά σε ρετρομετάθεση. Στην περίπτωση του CD133-2, τα κύτταρα του μάρτυρα είναι θετικά σε ποσοστό 19.15% ενώ στον κλώνο 11 το αντίστοιχο ποσοστό εκτοξεύεται στο 40%, εκ των οποίων το 36.4% αντιστοιχεί σε κύτταρα που είναι θετικά σε ρετρομετάθεση.



Εικόνα 3.29: Έλεγχος έκφρασης του δείκτη καρκινικών βλαστικών κυττάρων *CD133*. Κύτταρα μάρτυρας *A549* και κύτταρα του κλώνου 11 ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση των δεικτών *CD133-1* και *CD133-2* (κόκκινο κανάλι φθορισμού) σε συνάρτηση με το φθορισμό *EGFP* (άξονας *FL-1*, πράσινο κανάλι φθορισμού) χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Σε κάθε διάγραμμα ο σταυρός έχει τοποθετηθεί βάσει των κυττάρων μάρτυρα που δεν έχουν υποστεί σήμανση. Στα τεταρτημόρια που προκύπτουν, το κάτω αριστερά περιλαμβάνει κύτταρα που δεν εκφράζουν *CD133* ή *EGFP*, το κάτω δεξιά κύτταρα θετικά σε ρετρομετάθεση, το πάνω αριστερά κύτταρα που έχουν τον επίτοπο δέσμευσης του *CD133* και το πάνω δεξιά κύτταρα που ταυτόχρονα είναι θετικά σε ρετρομετάθεση και εκφράζουν το *CD133*. *PE*: φυκοερυθρίνη.

Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των ιδιοτήτων των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα που εκφράζουν το *CD133*. Έχουν εντοπιστεί δύο ισομορφές της πρωτεΐνης αυτής, το Oct-4 A και το Oct-4 B μήκους 360 και 265 αμινοξέων αντίστοιχα. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας Sox-2 είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση των ιδιοτήτων αυτοανανέωσης των μη διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων. Εξετάσαμε αν στα κύτταρα του κλώνου 11 αυξάνεται η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων μέσω ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών με RT-PCR. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για *GAPDH* (Εικ.3.30).



Εικόνα 3.30: Ανάλυση έκφρασης δεικτών διαφοροποίησης με RT-PCR. Απομονώθηκε RNA προς παραγωγή cDNA, από κύτταρα A549 και A549 κλώνου 11 το οποίο και ελέγχθηκε ως προς την έκφραση RNA των μεταγραφικών παραγόντων Oct-4 και Sox-2. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε cDNA από φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα HFL-1. Η κανονικοποίηση έγινε με GAPDH. M: δείκτης μοριακών μεγεθών GeneRuler 100bp, Thermo Scientific.

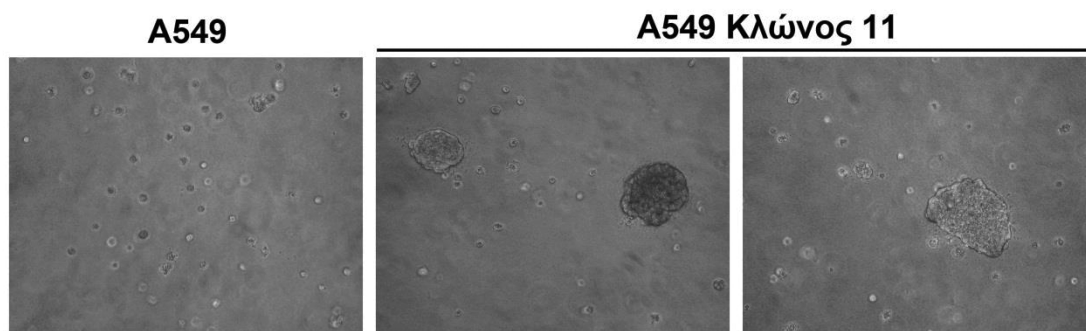
Η ένταση των ζωνών υπολογίστηκε με το πρόγραμμα πυκνομετρικής ανάλυσης Image J. Σύμφωνα με τα δεδομένα, ανιχνεύτηκε αυξημένη έκφραση RNA του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4 στα κύτταρα του κλώνου 11 κατά 2.1x φορές σε σχέση με τα A549 όσο αφορά τη ζώνη των 470 bp ενώ ανιχνεύτηκε και μια επιπλέον ζώνη η οποία πιθανώς αντιστοιχεί στην ισομορφή Oct-4b. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του Sox-2. Συνεπώς, η υψηλή ρετρομετάθεση που οδηγεί σε μεταβολή του φαινοτύπου των κυττάρων του κλώνου 11 συνδέεται με αυξημένη έκφραση του δείκτη αδιαφοροποίητων κυττάρων Oct-4.

3.6.2 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα έχουν την ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά μέσα και χαρακτηρίζονται από αυξημένο μεταστατικό δυναμικό.

Τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν αναπτυξιακούς παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες αλλά και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης για τη φυσιολογική ανάπτυξή τους. Απουσία των σημάτων αυτών οδηγούνται σε αναστολή του πολλαπλασιασμού

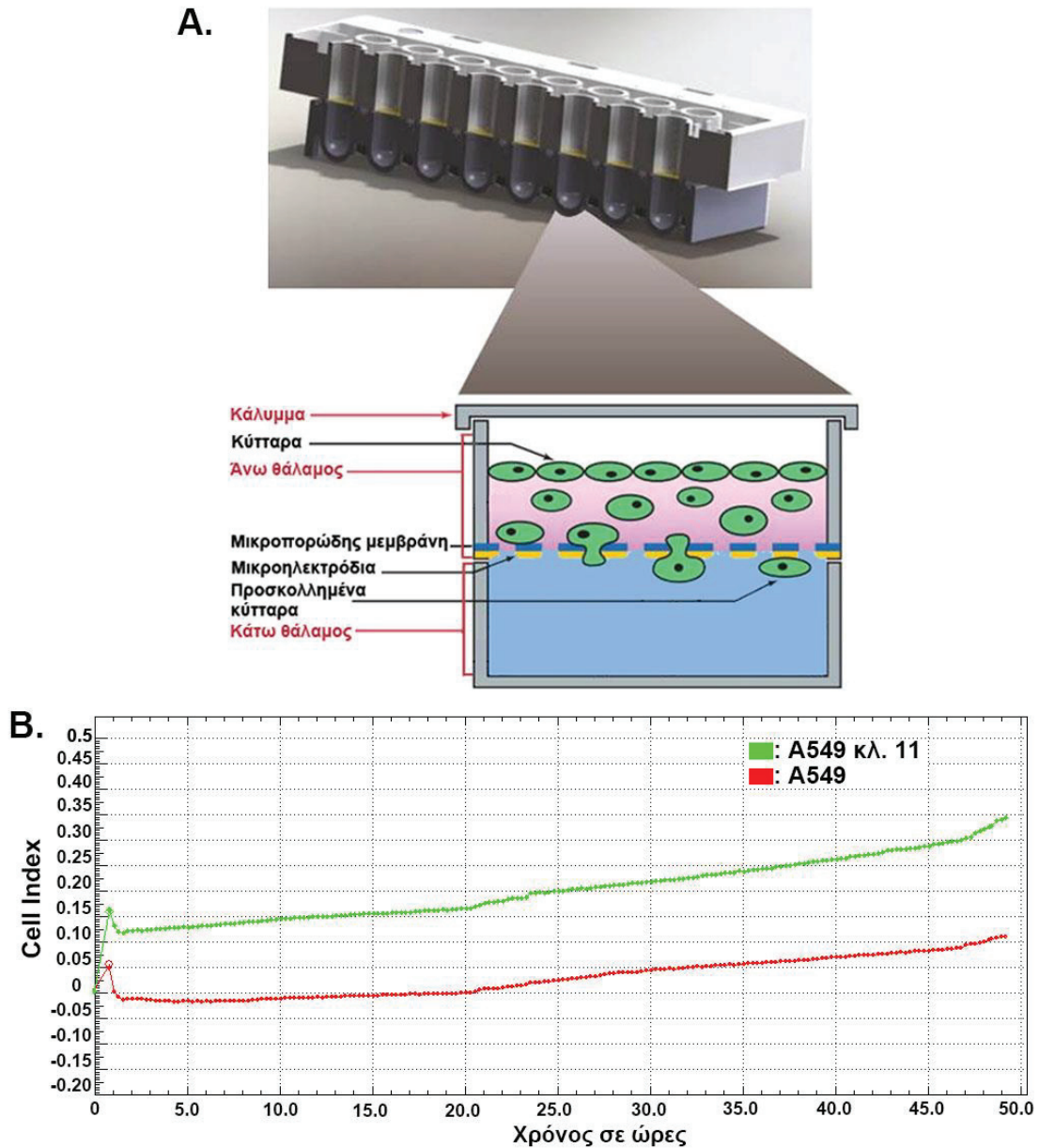
και απόπτωση. Αντιθέτως, ένα κριτήριο μετασχηματισμένων κυττάρων είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε ημιστερεά μέσα απουσία προσκόλλησης.

Η παρουσία σφαιρών κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια των κυττάρων του κλώνου 11, μας ώθησε να μελετήσουμε την δυνατότητα των κυττάρων αυτών να αναπτύσσουν εστίες (αποικίες) χωρίς υπόστρωμα προσκόλλησης (anchorage-independent foci). Προκειμένου να ερευνήσουμε το ενδεχόμενο αυτό, κύτταρα του κλώνου 11 όπως και μάρτυρα A549, αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο αγαρόζης συγκέντρωσης 0.33% με βασική στοιβάδα αγαρόζης 0.66% για 20 ημέρες (Εικ. 3.31).



Εικόνα 3.31: Εξέταση της ικανότητας σχηματισμού εστιών κυττάρων (anchorage-independent foci) σε κύτταρα κλώνου 11, θετικών σε ρετρομετάθεση SV4. 300.000 κύτταρα από κάθε περίπτωση αφέθησαν προς ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 1X A549/10% FBS/0.33% αγαρόζης για 16 ημέρες σε τρυβλία που είχε προηγουμένως τοποθετηθεί βασική στοιβάδα αγαρόζης 0.66%. Παρατηρείται ανάπτυξη αυξημένου μεγέθους εστιών κυττάρων στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα του κλώνου 11 που δείχνονται με βέλη.

Μετά το χρονικό διάστημα ανάπτυξης των κυττάρων για 18 ημέρες, παρατηρήθηκαν εστίες κυττάρων στα προς μελέτη θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα τόσο των μαζικών όσο και των μονήρων κλώνων στις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Αντίθετα στα κύτταρα-μάρτυρα A549, δεν αναπτύχθηκαν μεγάλες εστίες κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν επιπλέον μαρτυρία για τη μεταβολή του φαινοτύπου των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων.



Εικόνα 3.32: Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων A549 και A549 κλώνου 11. **A:** Σχηματική αναπαράσταση του ειδικού πολυτρυβλίου, CIM-Plate (CIM= Cell Invasion & Migration). Κάθε πηγάδι περιλαμβάνει άνω και κάτω υποθάλαμο που διαχωρίζονται από μεμβράνη με μικροπόρους. Η μεμβράνη περιλαμβάνει αισθητήρες ηλεκτροδίων στην κάτω επιφάνεια της, συνεπώς τα κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στον κάτω υποθάλαμο βρίσκονται σε άμεση επαφή με αυτούς και αυξάνουν την ηλεκτρική αντίσταση η οποία καταγράφεται από τον αναλυτή RTCA-DP. **B:** Η γραφική παράσταση απεικονίζει τη μεταβολή του μεταστατικού δυναμικού κυττάρων του μάρτυρα A549 και του θετικού σε ρετρομετάθεση κλώνου 11. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων, παρουσιάζονται το Cell Index (CI), δηλαδή μια ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει, συνάρτησης του χρόνου.

Η έκφραση του δείκτη καρκινικών βλαστικών κυττάρων CD133 και η ικανότητα ανάπτυξης εστιών άνευ προσκόλλησης μας οδήγησε να εξετάσουμε το αν η ρετρομετάθεση των SVA συνδέεται και με την απόκτηση δυνατότητας διείσδυσης

σε άλλους ιστούς. Βάσει αυτού, μελετήσαμε την πιθανή μεταβολή της κυτταρικής διεισδυτικότητας και μετανάστευσης μέσω του αναλυτή RTCA-DP (τεχνολογία RTCADP-Xcelligence). Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πολυτρυβλία (CIM plates) τα οποία χωρίζονται σε δυο διαμερίσματα από μια μεμβράνη PET (polyethyleneterephthalate) με μικροπόρους που είναι συζευγμένη με μικροηλεκτρόδια. Τα κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα μετανάστευσης, διαπερνούν τους μικροπόρους της μεμβράνης και προσκολλώνται στην κάτω επιφάνειά της αυξάνοντας την ηλεκτρική αντίσταση στους αισθητήρες των μικροηλεκτροδίων. Συνεπώς, η κινητική κατάσταση των κυττάρων καταγράφεται κάθε χρονική στιγμή και απεικονίζεται σε ειδικά γραφήματα. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων παρουσιάζεται το Cell Index (CI), δηλαδή μια ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει, συναρτήσει του χρόνου. Αλλαγές στην κατάσταση των κυττάρων, όπως η μορφολογία, κυτταρική βιωσιμότητα ή κυτταρική προσκόλληση επηρεάζουν επίσης το CI.

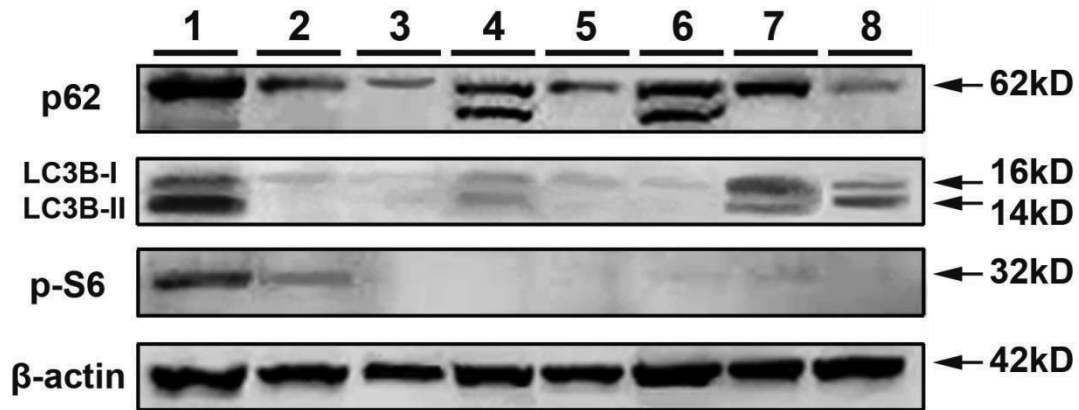
Στην Εικόνα 3.32, παρουσιάζεται η μεταβολή μεταστατικού δυναμικού του κλώνου 11 A549 που είναι θετικός σε ρετρομετάθεση σε σύγκρισή με τα κύτταρα του μάρτυρα A549. Παρατηρείται αύξηση του μεταστατικού δυναμικού του κλώνου σε σχέση με το μάρτυρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αυξημένα ρετρομεταθετικά γεγονότα προσδίδουν στα κύτταρα έναν πιο «επιθετικό» μεταστατικό φαινότυπο.

3.7 Έλεγχος συσχέτισης της υψηλής συχνότητας ρετρομετάθεσης με φαινόμενα αυτοφαγίας

Οι ρετρομεταθέσεις SVA οδηγούν σε αλλοίωση του κυτταρικού φαινοτύπου με έντονα τα φαινόμενα κυτταροπλασματικής κοκκίωσης. Τα κύτταρα εμφανίζουν επιπλέον, καθυστέρηση στον πολλαπλασιασμό και διογκωμένο μέγεθος. Είναι γνωστό πως παρουσία στρεσογόνου περιβάλλοντος όπως οξειδωτικό στρες, απουσία αναπτυξιακών και θρεπτικών παραγόντων ή ιική μόλυνση, η κυτταρική ανάπτυξη αναστέλλεται και ενεργοποιείται το μονοπάτι αυτοφαγίας.

Η δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων καθοδηγείται από τη συντονισμένη δράση μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται αποκλειστικά με αυτή τη διαδικασία. Η πρωτεΐνη p62 είναι ένα πολυλειτουργικό μόριο που προσδένει την LC3 (συσχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη ελαφριάς αλυσίδας - microtubule-

associated protein 1 light chain 3) και άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Atg8 και γίνεται μέρος του αυτοφαγοσώματος. Αυτό οδηγεί σε μεσολαβούμενη από αυτοφαγία αποδόμηση της p62 και γι αυτό η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιείται ως δείκτης (239).



Εικόνα 3.33: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για έλεγχο έκφρασης δεικτών αυτοφαγίας. Κυτταρικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από κύτταρα μάρτυρα A549 και καλλιέργειες κλώνων 6, 8 και 11 αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα που αναγνωρίζουν τους επιτόπους p62, τις δύο ισομορφές του LC3 και τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη S6. Για τον έλεγχο ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Η αντιστοίχιση διαδρομών-δειγμάτων είναι η εξής: **1:** A549 μάρτυρας, **2:** κλώνος 6, **3:** κλώνος 6 με φαινόμενα κυτταροπλασματικής κοκκίωσης, **4:** κλώνος 8, **5:** κλώνος 8 με φαινόμενα κυτταροπλασματικής κοκκίωσης, **6:** κλώνος 11, **7:** κλώνος 11 με φαινόμενα κυτταροπλασματικής κοκκίωσης, **8:** κύτταρα θετικός-μάρτυρας για φαινόμενα αυτοφαγίας που έχουν επωαστεί 2 ώρες με HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution).

Το μονοπάτι mTOR ρυθμίζει το μηχανισμό αυτοφαγίας και καταστέλλει τη δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων σε συνθήκες που επιτρέπουν την κυτταρική ανάπτυξη. Ελέγχει την έναρξη της μετάφρασης μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης δύο βασικών στόχων: της πρωτεΐνης EIF4E και της κινάσης S6K που φωσφορυλιώνει με τη σειρά της την πρωτεΐνη S6 που αποτελεί συστατικό του ριβοσώματος.

Για να αναλυθεί η έκφραση βασικών πρωτεϊνών που μετέχουν στο φαινόμενο της αυτοφαγίας απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα μάρτυρα A549 και κύτταρα καλλιέργειών μονήρων κλώνων 6, 8 και 11 τόσο πριν όσο και μετά την εμφάνιση φαινομένων αυξημένου μεγέθους και έντονης κυτταροπλασματικής κοκκίωσης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που είχαν επωαστεί για 2 ώρες με το διάλυμα HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) το οποίο περιέχει ισορροπημένη συγκέντρωση γλυκόζης και αλάτων ωστόσο στερείται αμινοξέων με αποτέλεσμα να επάγει αυτοφαγία στα κύτταρα.

Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα που αναγνωρίζει τους επιτόπους των πρωτεϊνών p62, LC3 και τη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης S6. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης πρωτεΐνης στα προς ανάλυση δείγματα.

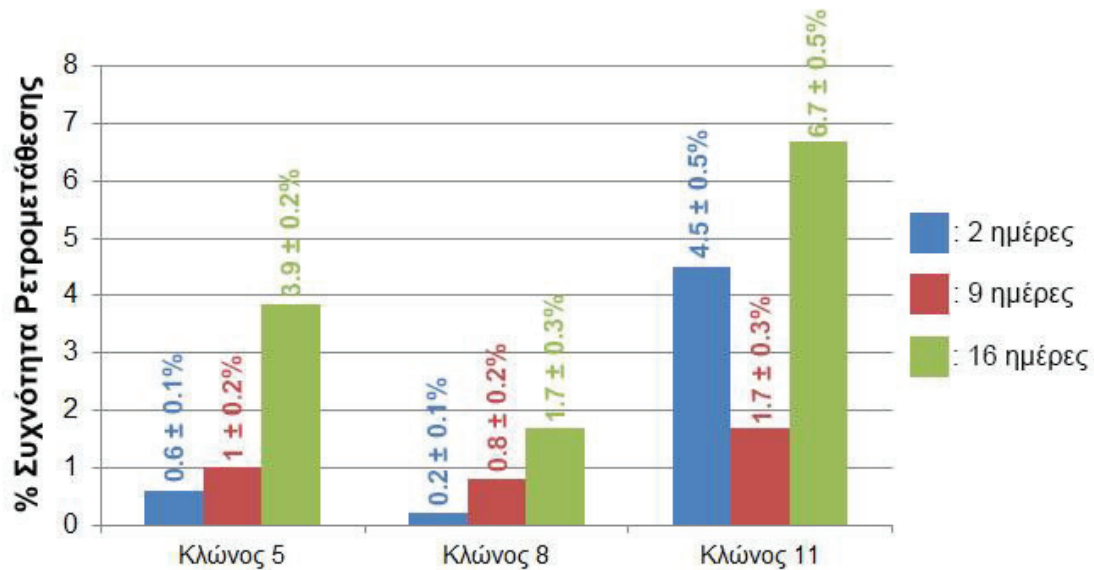
Όπως φαίνεται στην *Εικ. 3.33* τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p62 είναι αυξημένα σε κύτταρα μάρτυρα A549 (διαδρομή 1) και πολύ χαμηλά σε κύτταρα θετικά σε αυτοφαγία (διαδρομή 8). Παρατηρείται μείωσή της στους κλώνους (διαδρομές 2, 4 και 6) η οποία είναι εμφανέστερη σε κύτταρα με διογκωμένο μέγεθος και έντονη κοκκίωση. Όσο αφορά την πρωτεΐνη LC3 παρατηρούμε αύξηση της ισομορφής II στα κύτταρα A549 και στο θετικό μάρτυρα. Αυξημένη έκφραση της ισομορφής I εντοπίζεται στην διαδρομή 7 ενώ στις διαδρομές 2-6 η έκφραση και των δύο ισομορφών μειώνεται σημαντικά. Τέλος παρατηρούμε πως η πρωτεΐνη S6 εκφράζεται στα A549, μειώνεται στις διαδρομές 2 και 7 και απουσιάζει σε όλες τις άλλες περιπτώσεις.

3.8 Ο ρόλος της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροτρανσποζονίων L1 στην κινητοποίηση του SVAS_{MOC1-L}

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα γνωστά επιστημονικά δεδομένα, τα μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια όπως τα SVA και τα Alu, δανείζονται τις απαραίτητες αντίστροφες μεταγραφάσες από αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία όπως τα LINEs. Πολλές από τις γενωμικές ενθέσεις SVA που έχουν μελετηθεί φέρουν χαρακτηριστικά ρετρομετάθεσης που έχει μεσολαβηθεί από τα L1. Έτσι, σε ένα επόμενο στάδιο, εξετάσαμε το ρόλο της αντίστροφης μεταγραφάσης των L1, ORF2p στην trans-κινητοποίηση του SVAS_{MOC1-L}. Το πλαίσιο ανάγνωσης του ORF2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 150KDa με δράση ενδονουκλεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης.

Προς αυτή την κατεύθυνση κύτταρα κλώνων που έφεραν το σημασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο και είχαν χαμηλή, μεσαία και υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης, διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA ORF2 (ευγενική προσφορά του Prof. H.H. Kazazian Jr) το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Βλαστισιδίνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 5μg/ml του αντιβιοτικού για 7 ημέρες. Η

συχνότητα ρετρομετάθεσης του $SVAS_{MOC1-L}$ μετρήθηκε σε τρεις κλώνους έπειτα από 2, 9 και 16 ημέρες μετά το πέρας της επιλογής (Εικ. 3.34).



Εικόνα 3.34: Η επίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης *ORF2* των *LINE-1* στη ρετρομετάθεση του $SVAS_{MOC1-L}$. Κύτταρα τριών κλώνων διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο *pcDNA ORF2* και έπειτα από επιλογή ανθεκτικών κλώνων με Βλαστυιδίνη, η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε σε 3 χρονικά σημεία με *FACS*. Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

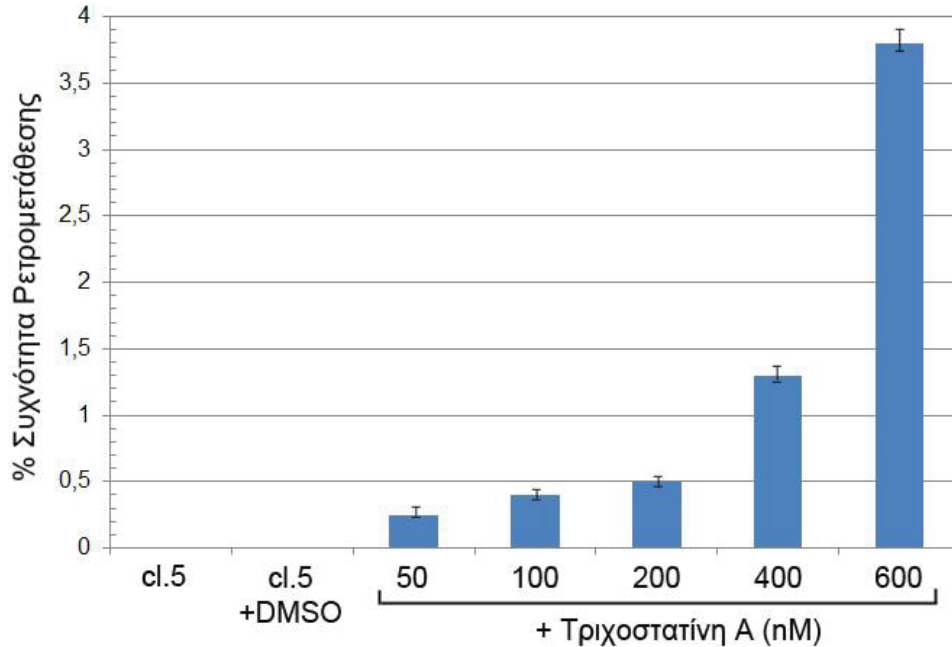
Όπως φαίνεται στην Εικ.3.34, με εξαίρεση το χρονικό σημείο των 9 ημερών στον κλώνο 11, η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο μετά το πέρας της επιλογής. Συμπερασματικά, η αντίστροφη μεταγραφάση των *LINE-1* εμπλέκεται στην κινητοποίηση του $SVAS_{MOC1-L}$.

3.9 Ρύθμιση της ρετρομετάθεσης του $SVAS_{MOC1-L}$ από επιγενετικούς παράγοντες

3.9.1 Η επίδραση της Τριχοστατίνης A

Η τριχοστατίνη A (TSA) αποτελεί ένα ειδικό αναστολέα των αποακετυλασών των ιστονών τάξεως I και II. Τα ένζυμα αυτά αφαιρούν ακετυλομάδες από τη χρωματίνη, οδηγώντας τελικά σε αύξηση ακετυλίωσης των ιστονών και επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων. Κύτταρα του κλώνου 5 A549 με χαμηλό ποσοστό

ρετρομετάθεσης, επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις TSA 50, 100, 200, 400 και 600 nM, ικανές για την αναστολή των HDACs (240). Έπειτα από επώαση 24 ωρών μετρήθηκε η επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης σε κάθε συγκέντρωση με μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα A549 του κλώνου 5 (Εικ 3.35).

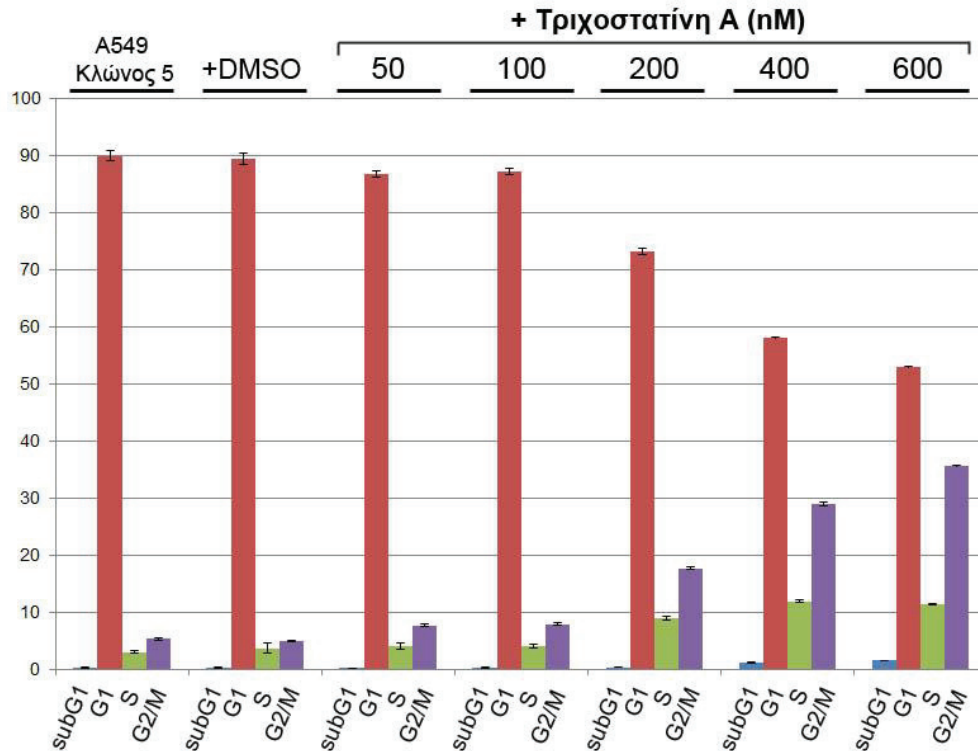


Εικόνα 3.35: Μέτρηση της ρετρομεταθετικής ενεργότητας του στοιχείου $SVA_{SMOC1-L}$ έπειτα από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων Τριχοστατίνης A. 230.000 κύτταρα A549 κλώνου 5 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6cm και επώαστηκαν με 50, 100, 200, 400 και 600 nM Τριχοστατίνης A. Έπειτα από 48 ώρες μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης των SVA με μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα. Οι στήλες αντιστοιχούν στο μέσο όρο ρετρομετάθεσης από 3 ανεξάρτητα πειράματα ($n=3$).

Παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της ρετρομετάθεσης του $SVA_{SMOC1-L}$ σε σχέση με το μάρτυρα, με μέγιστο ποσοστό τις 3.75 φορές στη συγκέντρωση των 600 nM. Το αποτέλεσμα αποδεικνύει ότι η τριχοστατίνη A, σε συγκεντρώσεις ικανές για την αναστολή των HDACs, επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των SVA σε κύτταρα A549.

Είναι γνωστό ότι η Τριχοστατίνη A οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στο σημείο ελέγχου κατά τη μετάβαση G2/M. Θελήσαμε να εξετάσουμε αν η ρετρομετάθεση συνδέεται με ή/και γίνεται επιτρεπτή από φαινόμενα διαταραχής των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Προς αυτή την κατεύθυνση, αναλύθηκε παράλληλα με κυτταρομετρία ροής ο κυτταρικός κύκλος κυττάρων μάρτυρα A549 του κλώνου 5 και των κυττάρων A549 cl.5 ανά

αυξανόμενες συγκεντρώσεις TSA, κατά την 3η μέρα καλλιέργειας οπότε και εμφανίζουν συχνότητα ρετρομετάθεσης 25.3% (Εικ. 3.36).

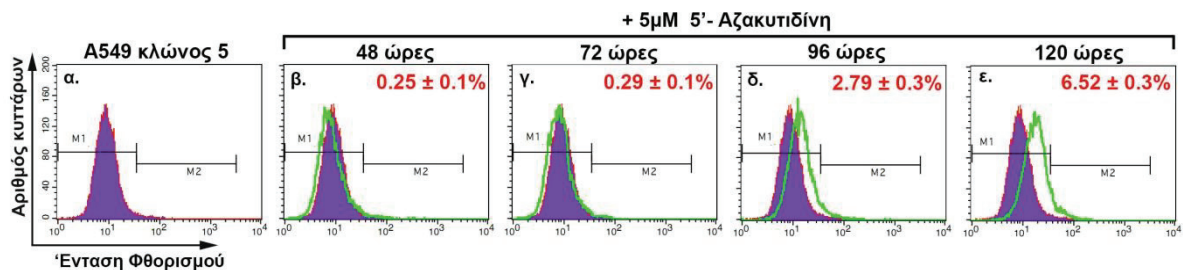


Εικόνα 3.36: Ανάλυση κυτταρικού κύκλου κυττάρων A549 του κλώνου 5, θετικών σε ρετρομετάθεση έπειτα από επίδραση Τριχοστατίνης A: Κύτταρα A549 cl.5 ή A549 cl.5 / με αυξανόμενες συγκεντρώσεις TSA, επώαστηκαν με 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ιωδιούχο Προπίδιο (PI) και έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. SubG1: υποδιπλοειδή κύτταρα. (ανεξάρτητα πειράματα $n=3$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Τριχοστατίνης A παρατηρείται αύξηση, του ποσοστού των κυττάρων που παραμένουν στο σημείο ελέγχου G2/M από 5.4- σε 35.5%. Επιπλέον, αυξάνεται από 3- σε 11.4% ο αριθμός των κυττάρων στα οποία πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του γενετικού τους υλικού (S). Το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης είναι συζευγμένη με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου.

3.9.2 Η επίδραση της Δεοξυ-5'-αζακυτιδίνης

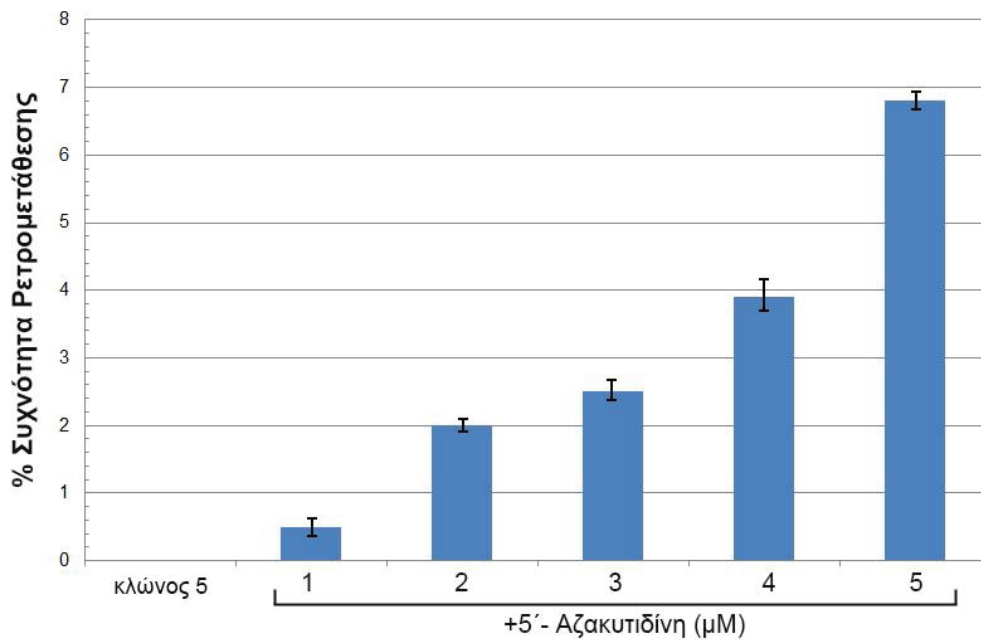
Ένας από τους μηχανισμούς που διαθέτει ένα κύτταρο για να αποσιωπήσει τα μεταθετά στοιχεία είναι η μεθυλίωση αλληλουχιών που είναι πλούσιες σε G-C. Τα SVA διαθέτουν τέτοια επαναλαμβανόμενα μοτίβα τόσο στα εξαμερή όσο και στην περιοχή VNTR. Για να εξετάσουμε αν η απομάκρυνση των μεθυλομάδων θα μπορούσε να αυξήσει τη μεταγραφή των ρετροτρανσποζονίων SVA και συνεπώς τη συχνότητα ρετρομετάθεσής τους, επώασαμε κύτταρα A549 του κλώνου 5 με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα 5'-Αζακυτιδίνη. Πρόκειται για ανάλογο νουκλεοζιδίων κυτιδίνης που ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA, προσδένει τις DNA μεθυλομεταφοράσες και μειώνει τα ποσοστά μεθυλίωσης στα νεο-δημιουργηθέντα κύτταρα.



Εικόνα 3.37: Η επίδραση της 5'-Αζακυτιδίνης στη συχνότητα ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOCI-L}. 120.000 κύτταρα A549 κλώνου 5 επώαστηκαν με συγκέντρωση 5μM 5'-Αζακυτιδίνης, καλλιεργήθηκαν περαιτέρω για 48 (β), 72 (γ), 96 (δ) και 120 (ε) ώρες και μετρήθηκε σε αυτά η συχνότητα ρετρομετάθεσης με κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζονται οι κατανομές και στο εσωτερικό αυτών τα ποσοστά ρετρομετάθεσης συγκριτικά με τα αμεταχειρίιστα κύτταρα μάρτυρα (α). Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (n=3).

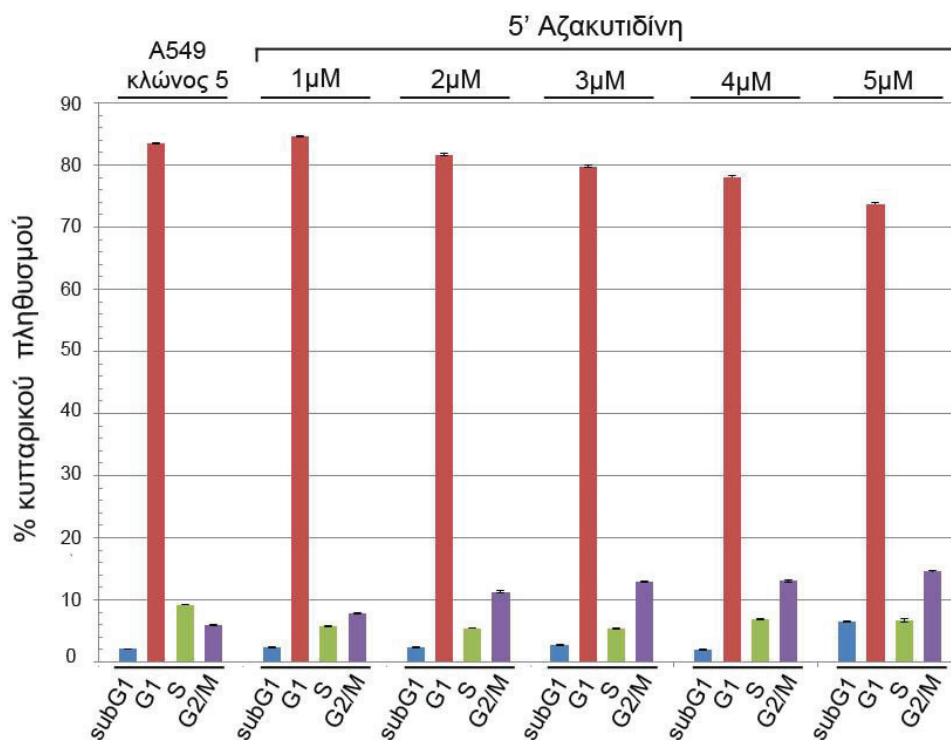
Συγκεκριμένα, επώασαμε κύτταρα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ουσίας, από 1 έως 5 μM και μετά από διάστημα 48 ωρών μετρήσαμε τη συχνότητα ρετρομετάθεσης. Στη συγκέντρωση των 5μM παρατηρήθηκε επαγωγή της ρετρομετάθεσης κατά ~0.3% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα ενώ οι συγκεντρώσεις 1-4μM δεν είχαν καμία επίδραση (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Με τη λογική πως το φαινόμενο της απομεθυλίωσης απαιτεί χρόνο και αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις, αποφασίσαμε να μελετήσουμε την χρονική εξέλιξή του, χρησιμοποιώντας τη μέγιστη των συγκεντρώσεων. Η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε σε 4 χρονικά σημεία και παρουσιάζεται στην Εικ.3.37.

Όπως παρατηρείται, η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξάνει κατά τρόπο χρονο-εξαρτώμενο από 0.25% στις 48 ώρες σε 6.52% στις 5 ημέρες (120 ώρες) ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση στις επόμενες μέρες (δεν παρουσιάζεται). Επιλέξαμε το χρονικό σημείο των 5 ημερών στο οποίο τα κύτταρα έχουν καταλάβει το 100% του ταπητίου και δεν πολλαπλασιάζονται περαιτέρω, για να κατασκευάσουμε ένα διάγραμμα δοσο-εξαρτώμενης μεταβολής της συχνότητας ρετρομετάθεσης. Επώασαμε 120.000 κύτταρα για 5 ημέρες με 1 έως 5 μM 5'-Αζακυτιδίνης και μετρήσαμε τη συχνότητα ρετρομετάθεσης με κυτταρομετρία ροής (Εικ. 3.38).



Εικόνα 3.38: Μέτρηση της ρετρομεταθετικής ενεργότητας των στοιχείων $SVA_{SMOC1-L}$ έπειτα από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 5'-Αζακυτιδίνης. 120.000 κύτταρα A549 κλώνου 5 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6cm και επώαστηκαν με 1-5 μM 5' Αζακυτιδίνης. Έπειτα από 5 ημέρες μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης των SVA με μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα. Τα ποσοστά αποτελούν το μέσο όρο μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

Όπως φαίνεται στην Εικ.3.38 αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5'-Αζακυτιδίνης επάγουν τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των SVA μέχρι και 6.8%, τιμή που σημειώνεται στην υψηλότερη συγκέντρωση των 5 μM . Ακολούθησε επανάληψη του παραπάνω πειράματος και μελέτη του κυτταρικού κύκλου έπειτα από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (Εικ. 3.39).



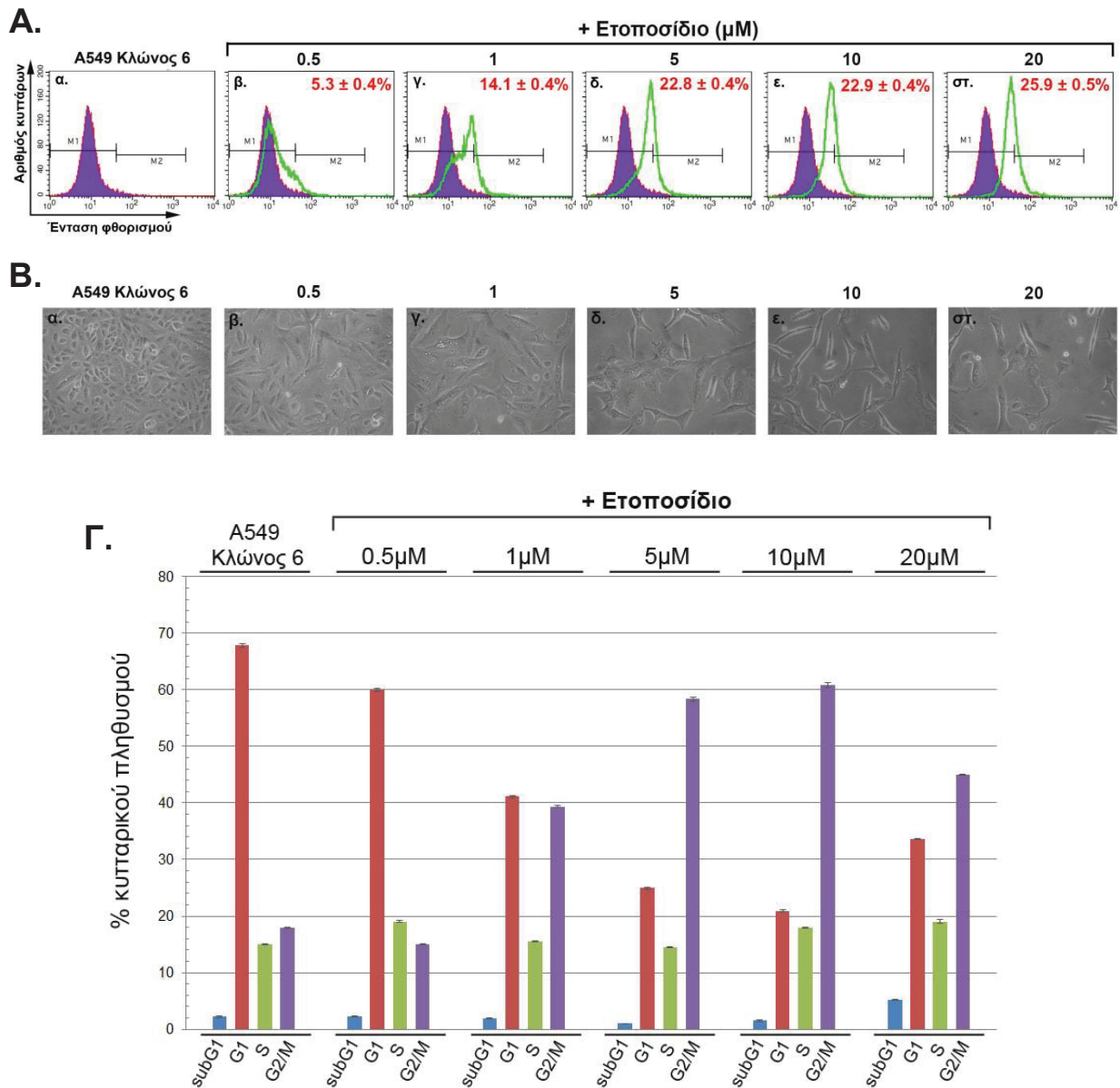
Εικόνα 3.39: Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου κυττάρων A549 κλώνου 5, θετικών σε ρετρομετάθεση έπειτα από επίδραση 5'-Αζακυτιδίνης: Κύτταρα A549 cl.5 ή A549 cl.5 τα οποία είχαν επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5'-Αζακυτιδίνης υπέστησαν χρώση με 50 μg/ml Ιωδιούχο Προπίδιο (PI) και έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. SubG1: υποδιπλοειδή κύτταρα. (ανεξάρτητα πειράματα $n=3$).

Παρατηρούμε πως σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ουσίας, αυξάνεται ο αριθμός των υποδιπλοειδών κυττάρων (subG1) από 2- σε 7.5% στη μέγιστη συγκέντρωση. Σταδιακά, με την αύξηση της συγκέντρωσης αυξάνει επίσης και ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στη μετάβαση G2/M από 5.8- σε 15%. Ο ρυθμός διπλασιασμού του γενετικού υλικού δε μεταβάλλεται σημαντικά.

3.10 Ρύθμιση της ρετρομετάθεσης του SVASMOCl-L από το αντικαρκινικό φάρμακο Ετοποσίδιο

Το ετοποσίδιο είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο που σταθεροποιεί το σύμπλοκο μεταξύ DNA και τοποϊσομεράσης II, οδηγώντας σε υψηλό ποσοστό σχάσεων στο DNA. Για να εξετάσουμε αν αυτός ο υψηλός αριθμός σχάσεων μπορεί να δημιουργήσει ένα επιτρεπτό περιβάλλον για ρετρομετάθεση,

επώασαμε κύτταρα A549 κλώνου 6 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ετοποσιδίου από 0.5 έως 20 μM για 24 ώρες. Αφήσαμε στη συνέχεια τα κύτταρα να ανανήψουν για άλλες 24 ώρες και, αφού τα φωτογραφίσαμε σε οπτικό μικροσκόπιο, μετρήσαμε τη συχνότητα ρετρομετάθεσης με κυτταρομετρία ροής. Χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες, αναλύθηκε και ο κυτταρικός κύκλος.



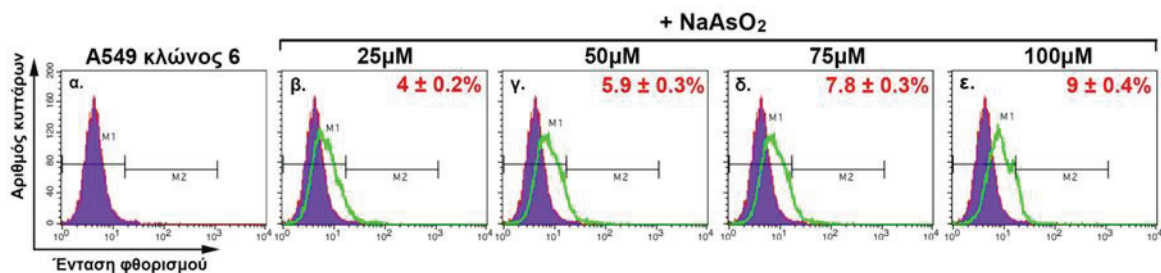
Εικόνα 3.39: *Αύξηση της ρετρομεταθετικής ενεργότητας των στοιχείων SV4 έπειτα από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων Ετοποσιδίου.* 240.000 κύτταρα κλώνου 6 επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ετοποσιδίου για 24 ώρες. Μετά από ανάνηψη 24 ωρών η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε με FACS (A) ενώ ο φαινότυπος των κυττάρων παρατηρήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο (B). Επιπλέον, αναλύθηκε ο κυτταρικός κύκλος σε όλες τις περιπτώσεις (Γ). Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

Παρατηρούμε στην Εικ. 3.39 πως το Ετοποσίδιο αυξάνει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο από 5.3% στα 0.5 μ M ως και 25.9% στα 20 μ M (Εικ. 3.39 Α). Η αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου οδηγεί σε υψηλή κυτταροτοξικότητα που συνοδεύεται από μεταβολή των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Εμφανίζονται κύτταρα διογκωμένα, με αυξημένη κοκκίωση και πεπλατυσμένο σχήμα σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα (Εικ. 3.39 Β). Ο κυτταρικός κύκλος αποκαλύπτει πως ο αριθμός των υποδιπλοειδών κυττάρων (subG1) είναι υψηλότερος σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ωστόσο σημαντική αύξηση παρουσιάζει το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G2/M (Εικ. 3.39 Γ).

3.11 Ρύθμιση της ρετρομετάθεσης του SVA_{SMOC1-L} από οξειδωτικό στρες

3.11.1 Η επίδραση του βαρέως μετάλλου Αρσενικού

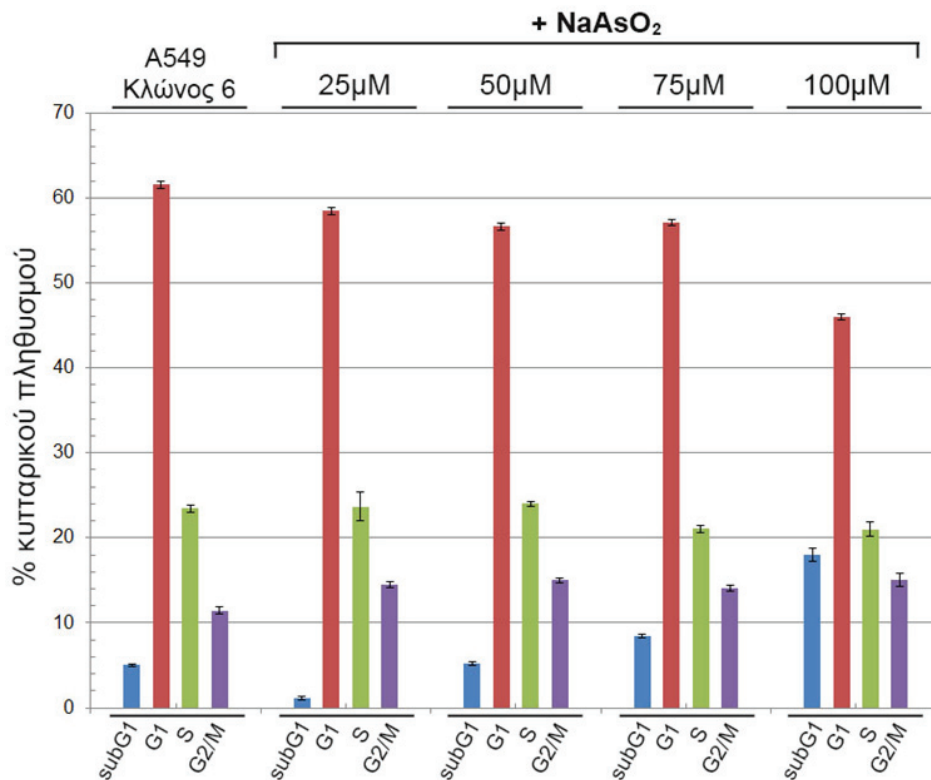
Το αρσενικό αποτελεί παράγοντα που με την εισαγωγή του στα κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Κατά αυτόν τον τρόπο προκαλείται οξειδωτικό στρες οδηγώντας σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και βλάβες στο DNA. Έρευνες έχουν συνδέσει το αρσενικό με την αναστολή του ενζύμου συνθετάση S-αδενοσυλομεθειονίνης και τη συνακόλουθη υπομεθυλίωση του γενώματος. Το γεγονός αυτό μας προέτρεψε να μελετήσουμε την επίδραση του αρσενικού στη ρετρομετάθεση των στοιχείων SVA.



Εικόνα 3.40: Το αρσενικό επάγει τη ρετρομετάθεση των SVA κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. 240.000 κύτταρα κλώνου 6 (α) επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 25-100 μ M (β-ε) μετα-αρσενικού νατρίου για 24 ώρες και τα θετικά σε EGFP κύτταρα μετρήθηκαν με FACS έπειτα από ανάνηψη 24 ωρών.

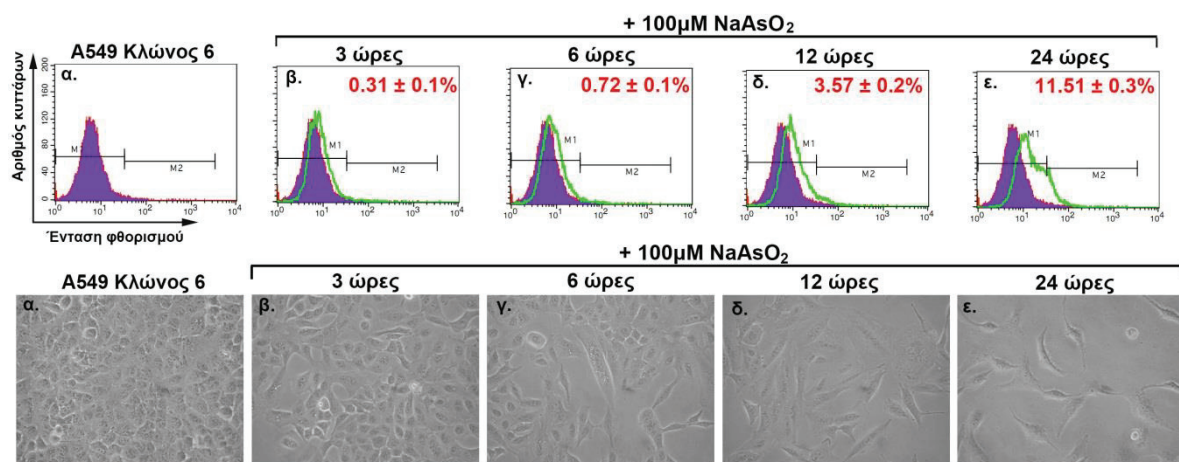
Χρησιμοποιήσαμε την πιο βιολογικά ενεργή μορφή του αρσενικού, δηλαδή την τρισθενή. Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του στην επαγωγή της συχνότητας

ρετρομετάθεσης, κύτταρα A549 του κλώνου 6 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετα-αρσενικού νατρίου (NaAsO_2) από 25-100 μM για 24 ώρες. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την κυτταροτοξικότητα του αρσενικού, το συγκεκριμένο εύρος επιλέχθηκε καθώς υψηλότερες συγκεντρώσεις ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έπειτα από 24 ώρες ανάνηψης, μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης με FACS. Η ανάλυση απέδειξε επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως μαρτυρούν οι μετατοπισμένες κατανομές φθορισμού σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα. Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 25 μM η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε στο 4% και σταδιακά αυξήθηκε στο 9% στη μέγιστη συγκέντρωση των 100 μM (Εικ. 3.40). Η αύξηση της συγκέντρωσης οδήγησε σε κυτταροτοξικά φαινόμενα αλλά και σε αυξημένο ποσοστό κυττάρων στη G2/M όπως αποκάλυψε η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 3.41).



Εικόνα 3.41: Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου κυττάρων A549 κλώνου 6, θετικών σε ρετρομετάθεση έπειτα από επίδραση με μετα-αρσενικό νάτριο: Κύτταρα A549 cl.6 ή A549 cl.6 τα οποία είχαν επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετα-αρσενικού νατρίου, υπέστησαν χρώση με 50 $\mu\text{g/ml}$ Ιωδιούχο Προπίδιο (PI) και έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. SubG1: υποδιπλοειδή κύτταρα. (ανεξάρτητα πειράματα $n=3$).

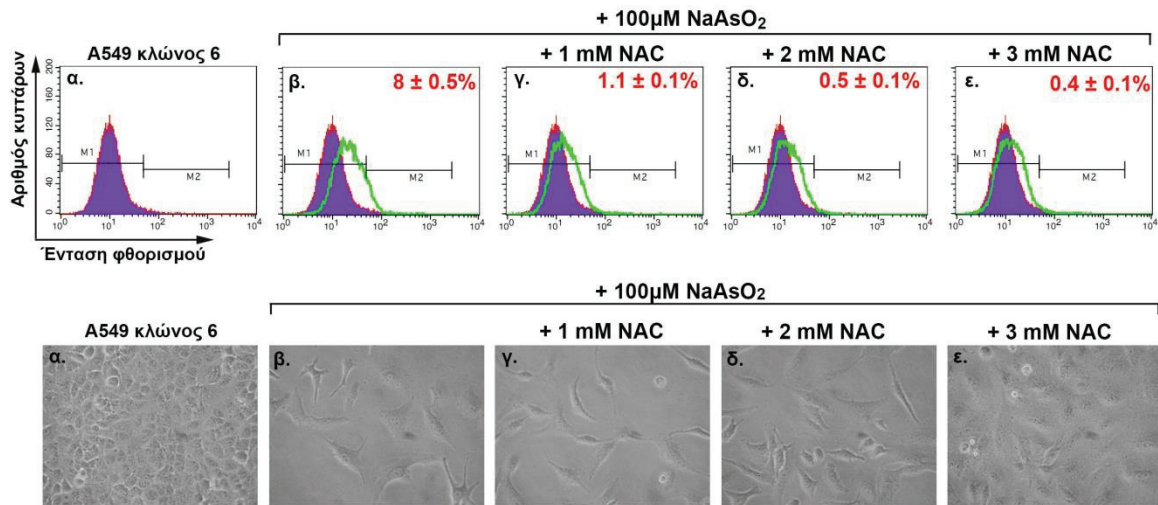
Στη συνέχεια, εξετάσαμε τη δράση του μετα-αρσενικού νατρίου στην επαγωγή της ρετρομετάθεσης SVA κατά χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, κύτταρα επώαστηκαν με 100 μ M μετα-αρσενικό νάτριο και αναλύθηκαν ως προς τη συχνότητα ρετρομετάθεσης χωρίς ανάνηψη και μετά το πέρας 3, 6, 12 και 24 ωρών. Σε κάθε χρονικό σημείο, παρατηρούνταν και φωτογραφίζονταν σε οπτικό μικροσκόπιο. Στις 3 και 6 ώρες παρατηρήθηκε μικρή επαγωγή της ρετρομετάθεσης σε συχνότητα 0.31- και 0.72%, αντίστοιχα. Η τιμή αυτή αυξήθηκε στο 3.57% στις 12 ώρες και έφθασε το 11.5% στις 24 ώρες. Συνολικά, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το αρσενικό επάγει τη ρετρομετάθεση των SVA κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικ. 3.42).



Εικόνα 3.42: Το αρσενικό επάγει τη ρετρομετάθεση των SVA κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. 240.000 κύτταρα A549 του κλώνου 6 (α) επώαστηκαν με 100 μ M μετα-αρσενικού νατρίου και η ρετρομετάθεση SVA μετρήθηκε με FACS στις 3, 6, 12 και 24 ώρες μετά την επίδραση (β-ε). Παράλληλα, στις ίδιες χρονικές στιγμές, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

Για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση πως η αύξηση της ρετρομετάθεσης έπειτα από επώαση με μετα-αρσενικό νάτριο οφείλεται σε παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, χρησιμοποιήσαμε τον αντιοξειδωτικό παράγοντα N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Η NAC είναι μια θειόλη, αποτελεί πηγή σουλφυδρυλομάδων στα κύτταρα και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες αλληλεπιδρώντας με ROS όπως OH \cdot και H₂O₂ (241). 240.000 κύτταρα A549 του κλώνου 6 προεπώαστηκαν με 1-3 mM NAC για 4 ώρες και μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος προστέθηκαν 100 μ M μετα-αρσενικού νατρίου. Ακολούθησε συν-επώαση 24 ωρών και αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Μετά από διάστημα 2

ημερών τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο και μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης με κυτταρομετρία ροής (Εικ. 3.43).



Εικόνα 3.43: Αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης $SVASMOCI-L$ παρουσία N -ακετυλοκυστεΐνης. 600.000 κύτταρα A549 προεπωάστηκαν με 1, 2 και 3 mM NAC για 4 ώρες. Ακολούθησε συνεπάωση με 100 μ M μετα-αρσενικού νατρίου για 24 ώρες. Η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής, μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας, με αρνητικό μάρτυρα κύτταρα A549 του κλώνου 5 και θετικό μάρτυρα κύτταρα του ίδιου κλώνου που είχαν επωαστεί μόνο με 100 μ M μετα-αρσενικού νατρίου. Σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

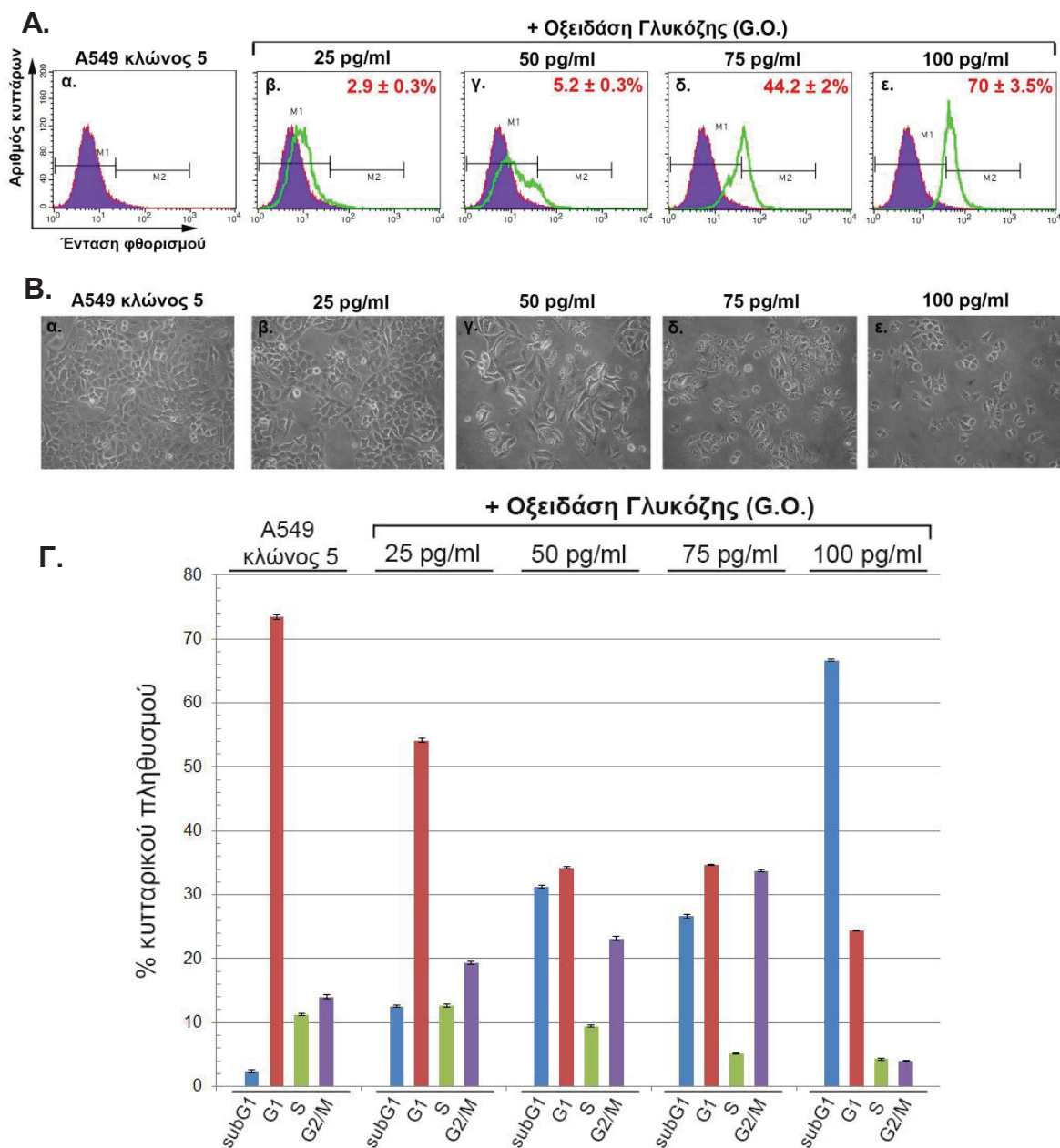
Παρατηρήθηκε ότι, μετά την επώαση με NAC, η συχνότητα ρετρομετάθεσης ανεστάλη κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο μέχρι και 95% στα 3 mM. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώθηκε παρατηρώντας τον κυτταρικό φαινότυπο και την αύξηση βιωσιμότητας των κυττάρων δεδομένου ότι σχεδόν επανέρχονται στο φαινότυπο του μάρτυρα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η ρετρομετάθεση που επάγεται από το αρσενικό είναι εξαρτώμενη οξειδωσης.

3.11.2 Η επίδραση του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου

Όπως διαπιστώθηκε από τα παραπάνω αποτελέσματα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των SVA. Ένας ακόμη παράγοντας οξειδωσης είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) που αποτελεί προϊόν αναερόβιου μεταβολισμού και, ακόμη και στοιχειώδεις συγκεντρώσεις του,

μπορούν να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες ελέγχοντας την έκφραση πληθώρας γονιδίων.

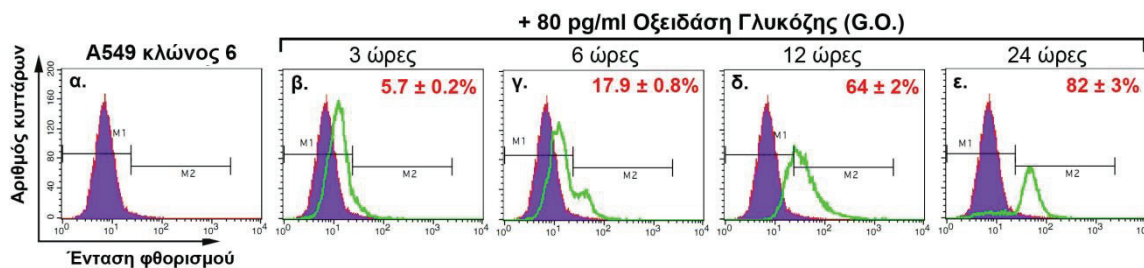
Σε προηγούμενη δημοσίευση της ερευνητικής μας ομάδας αποδείχθηκε πως το H₂O₂ επήγαγε τη ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30. Για να μελετήσουμε το ρόλο του στη ρετρομετάθεση των SVA, κύτταρα A549 διαφόρων κλώνων επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ενζύμου Οξειδάση της Γλυκόζης που καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε H₂O₂ και D-γλυκονολακτόνη. Μετά από διάστημα 24 ωρών έγινε αλλαγή θρεπτικού υλικού, ακολούθησε περαιτέρω καλλιέργεια για 2 ημέρες, οπότε και μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης ενώ τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Εικ. 3.44).



Εικόνα 3.44: Το υπεροξείδιο του υδρογόνου επάγει τη ρετρομετάθεση των SVA κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. **A.** 260.000 κύτταρα κλώνου 5 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 και η συχνότητα ρετρομετάθεσης μετρήθηκε με FACS στις 3, 6, 12 και 24 ώρες μετά την επίδραση. **B.** Παράλληλα, στις ίδιες χρονικές στιγμές, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. **Γ.** Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα ίδια κύτταρα μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο. Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

Παρατηρήθηκε ότι το H_2O_2 επάγει ισχυρά τη συχνότητα ρετρομετάθεσης η οποία είναι εξαρτώμενη της συγκέντρωσης του ενζύμου και αγγίζει το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό 70% στα 100 $\mu g/ml$. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου συνοδεύεται από έντονα φαινόμενα κυτταροτοξικότητας και αύξηση της πυκνότητας κοκκίων στο κυτταρόπλασμα τους. Η αύξηση των υποδιπλοειδών κυττάρων (subG1) κατά τη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου επιβεβαιώνει τα φαινόμενα κυτταροτοξικότητας. Επιπλέον, μέχρι και τη συγκέντρωση των 75 $\mu g/ml$ αυξάνει σημαντικά το ποσοστό των κυττάρων που παραμένουν στη μετάβαση G2/M.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τη δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην επαγωγή της ρετρομετάθεσης κατά χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, κύτταρα επωάστηκαν με 80 $\mu g/ml$ H_2O_2 και αναλύθηκαν ως προς τη συχνότητα ρετρομετάθεσης SVA χωρίς ανάνηψη, μετά το πέρας 3, 6, 12 και 24 ωρών.



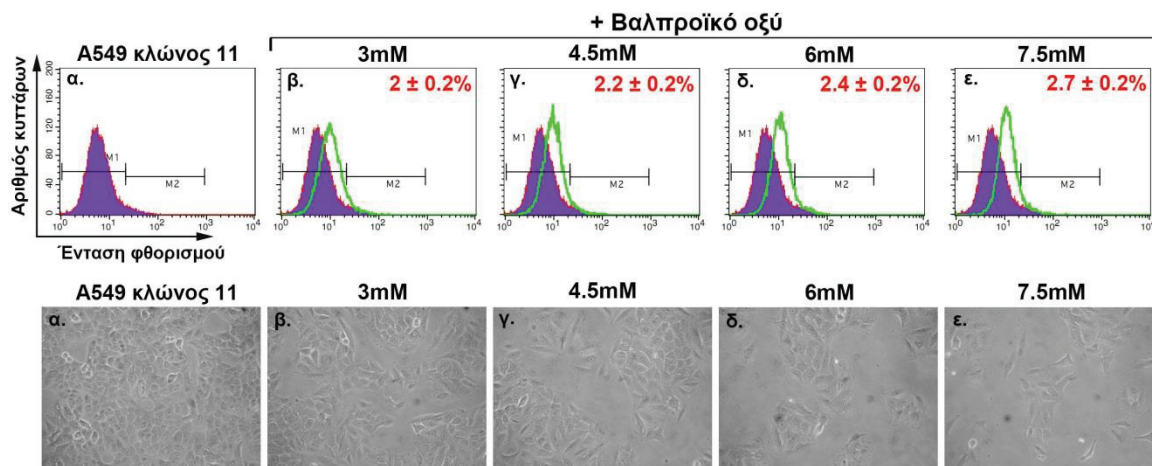
Εικόνα 3.45: Το H_2O_2 επάγει τη ρετρομετάθεση των SVA κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. 240.000 κύτταρα του κλώνου 6 επωάστηκαν με 100 μM H_2O_2 και η ρετρομετάθεση SVA μετρήθηκε με FACS στις 3, 6, 12 και 24 ώρες μετά την επίδραση. Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

Όπως φαίνεται στην *Εικ. 3.45*, στις 3 και 6 ώρες παρατηρήθηκε επαγωγή της ρετρομετάθεσης σε συχνότητα 5.7- και 17.9% αντίστοιχα. Η τιμή αυτή αυξήθηκε στο 64% στις 12 ώρες και έφθασε το 82% στις 24 ώρες. Συνολικά, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το H_2O_2 επάγει ισχυρά τη ρετρομετάθεση των SVA προκαλώντας φαινοτυπικές αλλοιώσεις και μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο.

3.11.3 Η επίδραση του Βαλπροϊκού οξέος

Το βαλπροϊκό οξύ είναι ένα λιπαρό οξύ βραχείας αλυσίδας που χρησιμοποιείται ως αντιεπιληπτικό φάρμακο αλλά χορηγείται και σε περιπτώσεις διπολικής διαταραχής. Λειτουργεί ως αναστολέας των απο-ακετυλασών και επάγει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (242, 243).

Για να μελετήσουμε το ρόλο του ως ένα επιπλέον παράγοντα που προκαλεί οξειδωτικό στρες, επιδράσαμε σε κύτταρα A549 κλώνου 11 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βαλπροϊκού οξέος 3-, 4.5-, 6- και 7.5 mM. Όπως παρουσιάζεται στην *Εικ. 3.46*, το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά σε ρετρομετάθεση βρέθηκε 2% στη συγκέντρωση των 3mM και δε μεταβλήθηκε σημαντικά στη μέγιστη συγκέντρωση των 7.5mM όπου άγγιξε την τιμή 2.7%. Παρατηρώντας τα κύτταρα στο οπτικό μικροσκόπιο δε διαπιστώσαμε κάποια φαινοτυπική αλλαγή, ωστόσο ο αριθμός των κυττάρων ελαττωνόταν ανα ml, όσο αύξανε η συγκέντρωση του φαρμάκου. Ο κυτταρικός κύκλος που πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση του DNA των κυττάρων με Ιωδιούχο Προπύδιο έδειξε μια ήπια αύξηση του αριθμού των κυττάρων στη φάση G1 από 82% στα κύτταρα μάρτυρα σε 89% στη μέγιστη συγκέντρωση (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Συμπερασματικά, το βαλπροϊκό οξύ επάγει τη ρετρομετάθεση των SVA και προκαλεί καθυστέρηση στην κυτταρική ανάπτυξη.



Εικόνα 3.46: Η επίδραση του βαλπροϊκού οξέος στη ρετρομετάθεση των SVA. **A.** 240.000 κύτταρα κλώνου 11 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βαλπροϊκού οξέος και η ρετρομετάθεση SVA μετρήθηκε με FACS στις 72 ώρες μετά την επίδραση. **B.** Παράλληλα, στις ίδιες χρονικές στιγμές, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα αναγραφόμενα ποσοστά είναι ο μέσος όρος μετρήσεων 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($n=3$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αναρριχώνται συνεχώς στο προσκήνιο του ενδιαφέροντος του ερευνητικού κόσμου καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γενετικής ποικιλομορφίας και αποτελούν γενετικές θέσεις πολυμορφισμού. Τα σύνθετα ρετρομεταθετά στοιχεία SVA αποτελούν την εξελικτικά νεότερη και μοναδική οικογένεια σύνθετων μη κωδικοποιών ρετρομεταθετών στοιχείων των Ανθρωπίδων (οικογένεια Hominidae). Αν και ο αριθμός τους στο γένωμα δεν ξεπερνά τα 2700 αντίγραφα, έχουν ήδη περιγραφεί δέκα ασθένειες με τις οποίες συσχετίζονται γεγονός που στοιχειοθετεί ότι είναι ρετρομεταθετικά ενεργά.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την RNA έκφραση των στοιχείων SVA σε ασθενείς με λεμφοβλαστικές λευχαιμίες σε σύγκριση με μη παθολογικά άτομα. Απομονώσαμε ένα ελλειμματικού μήκους SVA από ανθρώπινη λευχαιμία (SVA_{SMOC1-L}) το οποίο και αποδείξαμε πειραματικά ότι έχει την ικανότητα να ρετρομετατίθεται με υψηλή συχνότητα σε διαφορετικής προέλευσης κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, ελέγξαμε την επίδραση του οξειδωτικού στρες και διάφορων επιγενετικών παραγόντων στη συχνότητα ρετρομετάθεσής του.

4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση των SVA

Σε μια προσπάθεια χαρτογράφησης των αλληλουχιών SVA στο ανθρώπινο γένωμα, χρησιμοποιήσαμε τη βάση δεδομένων UCSC Table Browser σε συνδυασμό με τον αλγόριθμο Repeatmasker. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη έκδοση του ανθρώπινου γονιδιώματος Hg19, βρέθηκαν 2676 ενθέσεις SVA. Ο αριθμός αυτός προέκυψε έπειτα από αποκλεισμό των στοιχείων SVA που αποτελούσαν προϊόντα ανασυνδυασμού, γεγονός που θα αύξανε λανθασμένα το ποσοστό τους. Αυτός ο πολύ μικρός αριθμός σε σύγκριση με τις άλλες κλάσεις ρετροτρανσποζονίων, εξηγείται από την εξελικτική τους ηλικία καθώς πρόκειται για την πιο πρόσφατη οικογένεια ρετρομεταθετών στοιχείων που έχει ενσωματωθεί και πολλαπλασιαστεί στο ανθρώπινο γένωμα.

Έπειτα από διαχωρισμό των ενθέσεων ως προς το γενετικό τόπο στον οποίο εδράζονται, αποκαλύφθηκε σχεδόν ομοιόμορφη κατανομή στα χρωμοσώματα με

εξαίρεση το μεγάλο βραχίονα στο χρωμόσωμα Y και τους μικρούς βραχίονες των χρωμοσωμάτων 13, 14, 15, 21 και 22. Σε μια πρόσφατη έρευνα (32) η πυκνότητα των SVA σε κάθε χρωμόσωμα βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με τη γονιδιακή πυκνότητα ($R = 0,74$) κάτι το οποίο πιθανώς αντανακλά το γεγονός ότι η ανοιχτή χρωματίνη είναι πιο προσβάσιμη και «επιρρεπής» σε νέες ενθέσεις σε σχέση με την ανενεργή χρωματίνη (*Εικ. 3.1*).

Τα ρετροτρανσποζόνια, συμπεριλαμβανομένων και των SVA, μπορούν να έχουν επίπτωση στη γονιδιακή λειτουργία μέσω πολλών μηχανισμών, φαινόμενο που γίνεται εντονότερο, όταν εισέρχονται σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (16, 126). Επηρεάζουν μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές παραμέτρους δεδομένης της θέσης τους εντός των ιντρονίων και των υποκινητών. Ωστόσο, η λειτουργική σημασία των αλληλεπιδράσεων με τις μη κωδικοποιούσες περιοχές είναι δυσκολότερο να γίνει αντιληπτή σε σχέση με ενθέσεις που συμβαίνουν σε κωδικοποιούσες περιοχές. Όπως απέδειξε η ανάλυση με την υπολογιστική πλατφόρμα GREAT (Genomic Region Annotation Tool) και φαίνεται στην *Εικ. 3.2*, από το σύνολο των SVA, 163 (δηλαδή το 6.1% αυτών) βρίσκονται εντός 5kb ανοδικά και καθοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής γονιδίων. Αυτό συνεπάγεται πως υπάρχουσες ή νέες ενθέσεις θα μπορούσαν να επηρεάσουν σημαντικό αριθμό γονιδίων εκκινώντας «καταρράκτες αλλαγών» στη γονιδιακή έκφραση που θα είχαν σημαντικές επιπτώσεις στο φαινότυπο και την κυτταρική λειτουργία.

Επιπλέον, πολλά SVA βρίσκονται σε απόσταση μέχρι 10kb από τη θέση υποκινητών γονιδίων και κάποια συσχετίζονται με περισσότερα του ενός γονίδια. Η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική και συνεπάγεται πως στοιχεία της δομής του SVA θα μπορούσαν να δράσουν ως εναλλακτικοί υποκινητές ή ενισχυτές. Παραδείγματα αποτελούν οι περιπτώσεις α. του SVA ανοδικά του PARK-7 το οποίο έχει τη δυνατότητα να εκκινήσει τη μεταγραφή σε *in vitro* πειραματικό σύστημα (32) και β. ενός SVA-D ανοδικά του γονιδίου FUS που δρα σα μεταγραφικός ρυθμιστής όταν αναλύθηκε σε συστήματα με γονίδια αναφοράς *in vivo* και *in vitro* (244). Η εμπλοκή τους στην απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων ενισχύεται καθώς βλέπουμε στον *Πίνακα 3.1* ότι γειτνιάζουν με γονίδια που εμπλέκονται σε λευχαιμία και καρκίνο του μαστού και με γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μοτίβων zinc finger και Krüppel box που συναντώνται σε πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων. Στο εργαστήριό μας έχουμε παρατηρήσει πως για να συμβούν γεγονότα ρετρομετάθεσης απαιτούνται πολλαπλασιαστικά ενεργά κύτταρα και η συσχέτιση

των στοιχείων SVA με γονίδια που ελέγχουν το διπλασιασμό του κεντροσωματίου κατά την κυτταρική διαίρεση, μπορεί να συνδέεται με την παρατήρηση αυτή.

4.2 Ανάλυση μεταγραφής των SVA σε λευχαιμικούς ασθενείς

Στηριζόμενοι στη δημοσιευμένη πρότυπη αλληλουχία SVA στη βάση δεδομένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών Repeatmasker, κατασκευάσαμε ειδικούς εκκινητές για ανάλυση RT-PCR με δυνατότητα ενίσχυσης αλληλουχιών SVA διαφορετικών υποοικογενειών. Χρησιμοποιώντας δείγμα cDNA από λευχαιμικό ασθενή, διαπιστώσαμε ότι οι εκκινητές αυτοί μπορούσαν να ενισχύσουν ένα σύνολο αλληλουχιών με μοριακά μεγέθη ~0.9-1.6 kb, όπως φαίνεται στην *Εικ. 3.4*. Η πληθώρα ζωνών ήταν αναμενόμενη δεδομένου ότι το μοριακό μήκος των SVA στο γένωμα ποικίλει σημαντικά από 0.5-2.8 kb. Έπειτα από κλωνοποίηση και αλληλούχιση επιλεγμένων ζωνών ώστε να καλύπτεται όλο το φάσμα των μεγεθών, όλοι οι κλώνοι αποδείχθηκε ότι αντιστοιχούσαν σε αλληλουχίες SVA και συγκεκριμένα στις υποοικογένειες SVA-C και SVA-D (*Πίνακας 3.2*) και εντοπίζονταν εντός γονιδίων. Η ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν αποκλειστικά σε αυτές τις υποοικογένειες πιθανώς να οφείλεται, είτε α. στο μικρό αριθμό κλώνων που επιλέχθηκαν προς αλληλούχιση ή β. σε αυξημένη έκφραση RNA των συγκεκριμένων υπο-οικογενειών σε περιπτώσεις λευχαιμίας.

Αναφορικά με τους άλλους κλώνους, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι κλώνοι 6 και 30. Συγκεκριμένα, αυτοί εντοπίζονται στα ιντρόνια των γονιδίων ZSW1M5 (zinc finger, SWIM domain containing 5) και SMOC1 (Secreted Modular Calcium-binding protein 1), αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι τα ρετροτρανσποζόνια είναι μεταγραφικά κατεσταλμένα σε φυσιολογικά κύτταρα ενώ σε καρκινικά έχει περιγραφεί εκτεταμένος επαναπρογραμματισμός του επιγενετικού τοπίου που συμπεριλαμβάνει την υπομεθυλίωση DNA, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων και τη μεταγραφή [132, 145]. Στη λογική αυτή, πιστεύουμε ότι η ανίχνευση RNA των δεδομένων SVA κλώνων 6 και 30, πιθανώς οφείλεται είτε στο ότι η μεταγραφή τους εκκινείται από υποκινητές των αντίστοιχων γονιδίων ή ότι εκφράζονται μεταγραφικά σε υψηλότερο επίπεδο λόγω της υπομεθυλιωμένης κατάστασης του λευχαιμικού κυττάρου. Ωστόσο αυτό χρήζει περαιτέρω μελέτης δεδομένου ότι η ρύθμιση της RNA έκφρασης των SVA δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί.

4.3 Ιδιαιτερότητα ενός περιστατικού λευχαιμίας B-λεμφοκυτταρικής σειράς & απομόνωση ενός ελλειμματικού SVA

Αναφορικά με το περιστατικό λευχαιμίας που περιγράφηκε στην Ενότητα 3.2.2, πέραν της αυξημένης επαγωγής έκφρασης RNA των SVA, ανιχνεύτηκε: α. χρωμοσωμική μετατόπιση, β. μειωμένη μεταγραφική έκφραση του γονιδίου GAPDH σε σύγκριση με την αντίστοιχη της β-ακτίνης (*Εικ.3.5 A και B*) και γ. έλλειψη του μεταγραφήματος του γονιδίου της βιοτινιδάσης (αδημοσίευτα αποτελέσματα), η οποία επιβεβαιώθηκε με δύο ζεύγη ειδικών εκκινητών που κάλυπταν και τα τρία εξόνια του γονιδίου. Το πρώτο εύρημα δεν ήταν απρόσμενο δεδομένου ότι συχνές μετατοπίσεις/μεταθέσεις συμβαίνουν σε καρκινικά κύτταρα. Η συγκεκριμένη μετατόπιση που βρήκαμε συνδέεται βιβλιογραφικά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία B-κυτταρικής σειράς και εμπλέκει το γονίδιο MLL (245). Πάνω από 30 διαφορετικά γονίδια έχουν αναφερθεί ότι συμμετέχουν σε γεγονότα μετατοπίσεων σχετιζόμενα με το γονίδιο MLL και κάποιες πρωτεΐνες σύντηξης που προκύπτουν, έχουν ογκογόνο αποτέλεσμα (246).

Αναφορικά με το δεύτερο, δεδομένου ότι υπάρχει ένα αντίγραφο γονιδίου GAPDH στο ανθρώπινο γένωμα, είναι πιθανό εκτεταμένες μεταλλάξεις/μετατοπίσεις ενός υποπληθυσμού παθολογικών λευχαιμικών B-λεμφοκυττάρων να οδήγησαν σε αναστολή της έκφρασής του. Τέλος, η μη ανίχνευση μεταγραφήματος της βιοτινιδάσης μπορεί να οφείλεται είτε σε επιγενετικούς μηχανισμούς ή σε μεταλλάξεις του γονιδίου. Είναι αξιοσημείωτο ότι έχει αναφερθεί αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων επιγενετικά, μέσω βιοτινυλίωσης ιστονών (247). Σε αυτή τη περίπτωση είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η έλλειψη βιοτινιδάσης, μπορεί να δημιούργησε ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την έκφραση των στοιχείων SVA επιτρέποντας τη ρετρομετάθεσή τους, τη δημιουργία μεταλλάξεων και την επιβάρυνση του φαινοτύπου του ασθενούς.

Στη λογική κλωνοποίησης ενός SVA πλήρους μήκους, ο κλώνος 30 επιλέχθηκε προς μελέτη λόγω 100% ομολογίας του με δημοσιευμένη αλληλουχία SVA-D και γενωμικής θέσης του σε ιντρόνιο του SMOC-1, πλεονέκτημα που επέτρεπε τον σχεδιασμό εκκινητών για την απομόνωσή του. Η απομόνωση ήταν επιτυχής καθώς μέσω Nested PCR, ανιχνεύσαμε μία μοναδική ζώνη ενώ μετά από αλληλούχιση DNA αποδείχθηκε ότι οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες αντιστοιχούσαν

στο επιθυμητό SVA και εκατέρωθεν αυτού υπήρχαν μικρές περιοχές ~30 - 50 νουκλεοτιδίων του SMOC-1.

Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η σύγκριση του κλωνοποιηθέντος SVA_{SMOC-1L} με αντίστοιχες δημοσιευμένες αλληλουχίες SVA στη ίδια γενωμική θέση SMOC-1, αποκάλυψε μία μη αναμενόμενη έλλειψη τμήματος ~350 νουκλεοτιδίων στην περιοχή VNTR (*Εικ. 3.8*). Είναι γνωστό ότι η αλληλουχία SVA περιλαμβάνει δύο μη νοηματικά Alu-ομόλογα τμήματα, η λειτουργία των οποίων δεν έχει διασαφηνιστεί. Είναι πιθανό στην περίπτωσή μας, η περιοχή αυτή να λειτούργησε ως θέση για ομόλογο ανασυνδυασμό αλληλουχιών είτε με SVA ή με Alu. Σημειωτέον, το ανθρώπινο γένωμα περιλαμβάνει περίπου μια ένθεση Alu ανά 3kb (248) και είναι γνωστό ότι τα ανεστραμμένα στοιχεία Alu που βρίσκονται σε εγγύτητα μπορεί να δημιουργήσουν δομές φουρκέτας οδηγώντας σε θραύσεις διπλής έλικας και απαλοιφή γενωμικής περιοχής (249, 250), καθώς και να αποτελέσουν θέσεις για ομόλογο ανασυνδυασμό, οδηγώντας σε χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να στηριχθεί στην ίδια τη δομή της περιοχής VNTR. Το μεγάλο ποσοστό σε νουκλεοτίδια GC και η παρουσία παλίνδρομων αλληλουχιών GGGGGGTCAGCCCCC θα μπορούσε να οδηγήσει σε δημιουργία σταθερών δομών (32, 251, 252) που δημιουργούν πρόβλημα στην αντιγραφή και οδηγούν σε μείωση των αριθμών επαναλήψεων της περιοχής VNTR (73).

Πιστεύουμε ότι η έλλειψη αυτού του τμήματος θα μπορούσε να έχει καταστήσει το συγκεκριμένο SVA ρετρομεταθετικά ενεργό δεδομένου ότι έχει υποστηριχθεί ότι το μεγαλύτερο τμήμα του SVA δεν απαιτείται για τη ρετρομετάθεσή του. Ρετρομεταθετικά ενεργά στοιχεία μπορεί να μην έχουν εξαμερή ή και την Alu-like περιοχή (35, 37). Σε πειράματα μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης για την εύρεση πιθανού υποκινητή εντός του SVA, έχει βρεθεί ότι η πλήρης απαλοιφή του VNTR οδηγεί σε σημαντική μείωση του ρετρομεταθετικού δυναμικού ενώ αντιθέτως, η μερική απαλοιφή τμήματός του οδηγεί σε αύξηση της ρετρομετάθεσης (48). Προσφάτως, το VNTR έχει αναγνωρισθεί ως μια κύρια θέση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης zinc finger ZNF91, που εμπλέκεται σε μεταγραφική καταστολή (253). Επιπλέον, η περιοχή VNTR αποτελεί θέση μεθυλίωσης και έχει βρεθεί ότι είναι μεθυλιωμένη σε μη παθολογικούς ενήλικες (233). Η τελευταία πρόταση ισχυροποιείται από το εύρημά μας ότι το τμήμα του VNTR που λείπει, περιλαμβάνει θέσεις μεθυλίωσης σε διάφορες κυτταρικές σειρές όπως φαίνεται στην *Εικ. 3.9* που προκύπτει από αποτελέσματα πειραμάτων του ENCODE.

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η έλλειψη του τμήματος των 347 ζευγών βάσεων στο SVAS_{SMOC-1L} που περιελάμβανε θέσεις μεθυλίωσης (Εικ. 3.10) πιθανώς έδωσε τη δυνατότητα να μετατίθεται με μεγαλύτερη συχνότητα κάτι που μπορεί να συνέβαλε στη ραγδαία επιδείνωση της νόσου. Εξετάσαμε δείγματα DNA από 11 περιπτώσεις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας ώστε να προσεγγίσουμε το εύλογο ερώτημα του αν κύτταρα βλαστών άλλων ασθενών με χρόνια Β-λευχαιμία, έφεραν την ίδια ή αντίστοιχη έλλειψη. Αντίστοιχη έλλειψη ανιχνεύτηκε σε 3 εκ των 11 ασθενών (ποσοστό ~27%). Παράλληλα, παρατηρήθηκε και μια απόκλιση στο μήκος των SVA μεταξύ ασθενών και υγιών δειγμάτων. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί με βάση αναλύσεις ανθρώπινων γενωμάτων απ'όπου προκύπτει ότι τα SVA αποτελούν θέσεις πολυμορφισμού. Η πολυμορφική φύση των SVA εκτείνεται τόσο από τις διακυμάνσεις στο μήκος τους όσο και ως προς το αν υπάρχουν ή όχι στο γένωμα (32). Ανάλυση των διάφορων υποκατηγοριών SVA έχει αποδείξει ότι τα SVA-D, E, F και F1 είναι πολυμορφικά στον άνθρωπο (31, 35, 36). Υπάρχουν 14 ενθέσεις στο ανθρώπινο γένωμα αναφοράς HuRef που δεν υπάρχουν στο HGWD (112). Ένα παραδειγμα αποτελεί η παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων SVA στα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας HLA που ποικίλει ανάλογα με την εθνικότητα (254).

4.4 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου SVAS_{SMOC-1L}/EGFP-INT και έλεγχος παραγωγής γεγονότων ρετρομετάθεσης

Για να ελέγξουμε την ικανότητα του SVAS_{SMOC-1L} να ρετρομετατίθεται, χρησιμοποιήσαμε κασέτα ανίχνευσης ρετρομετάθεσης EGFP-INT. Η κατασκευή αυτή μπορεί να ανιχνεύσει γεγονότα ρετρομετάθεσης σε επίπεδο κυττάρου, επιτρέποντάς μας να προσδιορίζουμε τη συχνότητα ρετρομετάθεσης σε κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια με βάση την κυτταρομετρία ροής. Όταν μετρήσαμε τη συχνότητα ρετρομετάθεσης 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, παρατηρήσαμε ότι, είτε δεν παράγονται γεγονότα ρετρομετάθεσης ή αυτά παράγονται με μία σχετικά μικρή συχνότητα στις 24- που όμως αυξάνει σημαντικά στις 48 ώρες (Εικ. 3.14). Όσον αφορά τις πρώτες 24 ώρες, πιστεύουμε ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στο στρες που υφίστανται τα κύτταρα κατά την διαδικασία της διαμόλυνσης ενώ ο χρόνος των

48 ωρών δίνει την δυνατότητα ανάνηψης στην κανονική κυτταρική κατάσταση που πλέον επιτρέπει την παραγωγή ρετρομεταθέσεων.

Οι ρετρομεταθέσεις SVA που ποσοτικοποιήθηκαν με κυτταρομετρία ροής αντανακλούν πραγματικά γεγονότα ρετρομετάθεσης για τρεις λόγους. Πρώτον, από το σημασμένο SVA, εκ κατασκευής, δε μπορεί να εκφραστεί η πράσινη φθορισμογόνος πρωτεΐνη (EGFP) παρά μόνο και αποκλειστικά μετά από μεταγραφή, αντίστροφη μεταγραφή του ματισμένου μεταγραφήματος και ενσωμάτωσή του στο γένωμα (*Εικ. 1.13*). Επιπλέον, οι ρετρομεταθέσεις SVAS_{MOC-1L} πιστοποιήθηκαν ως νέα ενσωματωμένα αντίγραφα στο γένωμα μέσω PCR, παράγοντας τις αναμενόμενες ζώνες των 1243- και 342bp ενώ η έκφραση της EGFP παρατηρήθηκε και σε μικροσκόπιο UV ως πράσινος φθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα κλώνων. Τα δεδομένα αυτά αποδुकνείουν την ειδικότητα της ρετρομετάθεσης SVA.

Είναι γνωστό ότι γεγονότα ρετρομετάθεσης συμβαίνουν σπάνια σε φυσιολογικά κύτταρα και έχει υπολογιστεί πως συμβαίνει περίπου 1 νέα ένθεση ανά 916 ζυγωτά (112). Αντιθέτως, τα μετασχηματισμένα κύτταρα παρέχουν ευνοϊκό περιβάλλον για τη γένεση ρετρομεταθετικών γεγονότων (65). Η παρούσα μελέτη συμφωνεί με το παραπάνω, δεδομένου ότι ρετρομεταθέσεις ευρέθηκαν στις πέντε (5) διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές: H1299, A549, HeLa, Jurkat και HUT-78. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι βρήκαμε μία σημαντική απόκλιση τιμών συχνότητας ρετρομετάθεσης μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Πιστεύουμε, κατά πρώτον, ότι οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται ή αντανακλούν την προέλευση κάθε κυτταρικής σειράς, που ίσως αποτελεί ένα ευνοϊκό ή λιγότερο ευνοϊκό ιστο-ειδικό κυτταρικό περιβάλλον γένεσης ρετρομεταθέσεων (94). Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί πως σε ομόλογο κυτταρικό τύπο με αυτόν απ όπου απομονώθηκε (λευχαιμικές κυτταρικές σειρές Jurkat και HUT-78), το SVAS_{MOC1-L} ρετρομετατίθεται σε πολύ υψηλή συχνότητα και προκαλεί φαινόμενα κυτταροτοξικότητας.

Επιπλέον, οι διαφορές συχνότητας της ρετρομετάθεσης που παρατηρήθηκαν μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες που επηρεάζουν τη μέτρηση της έκφρασης EGFP όπως π.χ.: α. τα αντίγραφα SVA που ρετρομετατίθενται να εισάγονται σε περιοχές παρακαείμενες αρνητικών ρυθμιστικών στοιχείων, β. η EGFP να είναι τοξική όταν εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, συμβάλλοντας σε κυτταροτοξικά ή αποπτωτικά φαινόμενα (255) και γ. να συμβαίνει επιγενετική αποσιώπηση ενός αντιγράφου SVA, στην περίπτωση των μονήρων κλώνων, δεδομένου ότι η ανάλυσή τους απαιτεί διάστημα ~20-25 ημερών έπειτα από την αντιβιοτική επιλογή και την ανάνηψή τους.

Τα παραπάνω υποστηρίζουν ότι κάποια γεγονότα ρετρομεταθέσεων που συνέβησαν, μπορεί να μην ανιχνεύονται ή τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα να οδηγούνται σε θάνατο. Η κυτταρομετρία ροής δίνει τη δυνατότητα επιλογής των ζωντανών κυττάρων (gate) και η μέτρηση των γεγονότων ρετρομετάθεσης πραγματοποιείται μόνο σε αυτά. Είναι, δηλαδή, πιθανό ότι γεγονότα ρετρομετάθεσης συμβαίνουν με πολύ μεγαλύτερη συχνότητα από αυτή που μπορούμε να ανιχνεύσουμε.

Μία σημαντική διαφορά στην ανάλυση των κυτταρικών σειρών H1299 και A549 οι οποίες έχουν την ίδια προέλευση (πνεύμονας), ήταν το ότι η πρώτη παρήγαγε ένα μεγάλο αριθμό κλώνων οι οποίοι πολλαπλασιάζονταν ταχύτατα ενώ η δεύτερη παρήγαγε ένα μικρό αριθμό κλώνων που χαρακτηρίζονταν από αναστολή του κυτταρικού κύκλου και μεγάλο χρόνο διπλασιασμού. Στους κλώνους A549 παρατηρήθηκαν κυτταροτοξικά φαινόμενα που ήταν εντονότερα στις περιπτώσεις όπου η ρετρομετάθεση ήταν αυξημένη. Είναι χαρακτηριστικό πως τα κύτταρα του κλώνου 9 A549, επιβίωσαν μόνο για ~2 μήνες σε καλλιέργεια. Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας έχει βρεθεί ότι η ρετρομετάθεση των VL30 σε κύτταρα ποντικού, προκαλεί κυτταρικό θάνατο που εξαρτάται από τη δράση της p53 (256). Είναι γνωστό πως τα A549 έχουν λειτουργικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ενώ στα H1299 αυτό είναι μεταλλαγμένο (ATCC). Επιπλέον, γεγονότα ρετρομετάθεσης οδηγούν σε βλάβες του DNA όπως έχει αποδειχτεί για τα LINE-1 (257) καθώς ένα σημαντικό βήμα στην ένθεση ενός νέου αντιγράφου στο γένωμα, είναι η δημιουργία σχάσεων στο DNA από μια ενδονουκλεάση (27). Με βάση τα παραπάνω, πιστεύουμε ότι η έλλειψη p53 στα H1299 επέτρεψε τη συσσώρευση γεγονότων ρετρομετάθεσης με σύγχρονη απουσία φαινομένων κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, στα A549 υπήρξε επαγωγή κυτταρικού θανάτου μεσολαβούμενου από p53 που κατά συνέπεια οδήγησε στην παραγωγή μικρού αριθμού κλώνων με έντονα κυτταροτοξικά φαινόμενα στις περιπτώσεις αυξημένων γεγονότων ρετρομετάθεσης.

Είναι γνωστό ότι για τη γένεση ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης απαιτούνται: το μεταγράφημα του ρετροτρανσποζονίου και η περαιτέρω μετατροπή του σε cDNA από μία ενεργή αντίστροφη μεταγραφάση, που συνήθως έχει αυξημένη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα. Αν και η παρούσα μελέτη δεν μας επιτρέπει την στοιχειοθέτηση του μηχανισμού ρετρομετάθεσης των SVA, πιστεύουμε ότι οι καρκινικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις επιτρέποντας αυξημένη μεταγραφή των SVA και παρέχοντας ενδογενείς αντίστροφες μεταγραφάσες, που δρουν *in trans*. Το τελευταίο είναι απαραίτητο καθώς τα SVA, ως μη αυτόνομα

ρετροτρανσποζόνια δεν έχουν κωδικοποιό δυναμικό. Η παρατηρηθείσα αύξηση της ρετρομετάθεσης του SVAS_{MOC1-L} έπειτα από συνδιαμόλυνση με πλασμίδιο που εκφράζει την αντίστροφη μεταγραφάση ORF2 των LINE-1 (Εικ. 3.34) συμφωνεί με αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων (48, 50).

4.5 Κυτταρικές επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης SVAS_{MOC1-L} σε κλώνους A549

4.5.1 Γενικές παρατηρήσεις

Μία εξαιρετικά ενδιαφέρουσα παρατήρηση της μελέτης μας ήταν το ότι η ρετρομετάθεση SVA συνοδεύθηκε από κυτταρικό θάνατο αλλά και μεταβολή του κυτταρικού φαινοτύπου. Όσον αφορά το πρώτο, παρατηρήσαμε την ύπαρξη κυτταροτοξικών φαινομένων μέσω κυτταρικής διόγκωσης και στρογγυλοποίησης στα A549 (Εικ. 3.23), νεκρών κυττάρων στα HeLa (Εικ. 3.16) ενώ η ανάπτυξη των Jurkat και των HUT-78 υπήρξε αρκετά προβληματική. Στις περιπτώσεις των λευχαιμικών κυτταρικών σειρών, μόνο μετά από διάστημα πολλών εβδομάδων κατέστη δυνατή η λήψη ικανού αριθμού κυττάρων και μέτρηση της ρετρομετάθεσης τους. Η κυτταροτοξικότητα αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί ως αποτέλεσμα του μεγάλου αριθμού των νέων ενσωματώσεων που οδηγούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο όπως έχει αποδειχθεί για το ρετροτρανσποζόνιο VL30, σε πρόσφατη εργασία του Εργαστηρίου μας (256). Είναι γνωστό ότι η ένθεση των μεταθετών στοιχείων σε ιντρόνια μπορεί να αλλάξει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ή να οδηγήσει σε παραγωγή τροποποιημένων μεταγράφων που αλλάζουν τη γονιδιακή έκφραση συμπεριλαμβανομένων των ογκογόνων μεταγράφων (258).

Σχετικά με τις φαινοτυπικές μεταβολές, τα διαμολυσμένα με το SVAS_{MOC1-L} κύτταρα A549 και HeLa εμφάνιζαν εκτεταμένα ελασματοπόδια/φυλλοπόδια) και αυξημένη κοκκίωση στο κυτταρόπλασμά τους ενώ σε μεγάλο ποσοστό ήταν πολυπύρηννα υποδεικνύοντας γενωμική αστάθεια. Είναι γνωστό ότι: α. τα ελασματοπόδια δημιουργούνται μέσω τοπικού πολυμερισμού ινιδίων ακτίνης και, προσκολλώμενα στο υπόστρωμα, επιτρέπουν την κυτταρική μετανάστευση [141] και β. τα καρκινικά κύτταρα λαμβάνοντας χημειοτακτικά και μεταναστευτικά ερεθίσματα κινούνται προς τα αγγεία, εκτείνοντας ελασματοπόδια [142]. Σε συμφωνία με αυτό,

πιστεύουμε ότι η ρετρομετάθεση των SVA θα μπορούσε να ενισχύσει το μεταστατικό δυναμικό μετασχηματισμένων κυττάρων.

Οι κλώνοι που έχουν αυξημένα γεγονότα ρετρομετάθεσης SVAS_{SMOC-1L} εμφανίζουν, επιπλέον, μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και σε ορισμένους κλώνους ο κυτταρικός κύκλος σταματά στη μετάβαση G2/M (Εικ. 3.24, 3.36, 3.39, 3.44). Είναι γνωστό πως η αυξημένη έκφραση ρετρομεταθετών στοιχείων σχετίζεται με μη φυσιολογικές χρωμοσωμικές δομές και συνακόλουθη γενωμική αστάθεια (259, 260). Οι μέχρι τώρα έρευνες υποστηρίζουν πως τα SVA στηρίζονται στο μηχανισμό των LINEs για την κινητοποίησή τους. Η ενδονουκλεάση που κωδικοποιείται από τα LINEs προκαλεί ένα μεγάλο αριθμό σχάσεων διπλής έλικας (DSB-double strand breaks) που μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα κυτταρικού θανάτου (259). Η μετάθεση μέσω του μηχανισμού TRPT (Target Primed Reversed Transcription – αντίστροφη μεταγραφή πριμοδοτούμενη από αλληλουχία στόχο) οδηγεί σε διπλασιασμό της θέσης όπου έχει γίνει σχάση από την ενδονουκλεάση των L1. Η διατήρηση των διπλασιασμένων θέσεων εκατέρωθεν του στοιχείου επιτρέπει επιπλέον σχάσεις από άλλες ενδονουκλεάσες. Οι σχάσεις που δημιουργούνται δίνουν τη δυνατότητα δημιουργίας γεγονότων αναδιάταξης αλλά οδηγούν και σε μια δευτερεύουσα απόκριση του κυττάρου που περιλαμβάνει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (261). Αυτό συμβαίνει μέσω ενεργοποίησης της κινάσης ATM η οποία μειώνει τον αριθμό των κυττάρων που μπαίνουν στη φάση της μίτωσης (262, 263). Η κινάση απαιτείται για την στάση του κυτταρικού κύκλου αλλά φωσφορυλιώνει επίσης πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση των σχάσεων και έχει υποστηριχθεί πως είναι απαραίτητη για τη ρετρομετάθεση των L1. Με βάση τα ανωτέρω θα ήταν ενδιαφέρον να συσχετισθεί η ρετρομετάθεση των SVA με την έκφραση της ATM.

4.5.2 Η ρετρομετάθεση SVA επάγει φαινόμενα αυτοφαγίας

Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε καταστάσεις στρες, παρατηρούνται γεγονότα αυτοφαγίας που αφορούν τη συσσώρευση κυτταροπλασματικών συστατικών σε κυστίδια και την αποικοδόμησή τους έπειτα από σύντηξη με λυσοσώματα. Γενικά τα RNA στοχεύονται για αυτοφαγική αποδόμηση σε δομές όπως σωματίδια στρες (264). Έχει υποστηριχθεί ότι η αυτοφαγία δρα ως μηχανισμός αναστολής γεγονότων ρετρομετάθεσης καθώς RNAs των Alu και LINE-1 έχουν βρεθεί σε αυτοφαγοσώματα

(265). Επιπλέον, η αυτοφαγία εμποδίζει το ρυθμό ένθεσης των ρετρομεταθετών αυτών στοιχείων χρησιμοποιώντας τους υποδοχείς αυτοφαγίας p62 για τη στόχευση των Ρ-σωματιδίων και, κυρίως, των συσσωμάτων στρες προς αποδόμηση. Συνεπώς, θα ήταν αναμενόμενο το ρετροτρανσποζονιακό RNA να αποδομείται μέσω αυτοφαγίας και η παρεμπόδιση της διαδικασίας αυτής να οδηγεί σε συσσώρευση των RNA και σε γενωμικές ενθέσεις (265, 266).

Εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης τριών βασικών πρωτεϊνών στο φαινόμενο αυτό, της p62, της φωσφορυλιωμένης S6 και των LC3-I και II. Η p62 εντοπίζεται στα αυτοφαγοσώματα και τα επίπεδά της ελέγχονται συνεχώς μέσω αποικοδόμησης (151). Η διαταραχή της αυτοφαγίας οδηγεί σε μαζική συσσώρευση της p62 που είναι τοξική. Όταν η αυτοφαγία είναι ενεργοποιημένη, η p62 αποδομείται ταχέως και τα επίπεδά της μειώνονται στις πρώτες ώρες έλλειψης θρεπτικών αλλά επανέρχονται μετά από μακρόχρονη περίοδο έλλειψης θρεπτικών (267). Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε μείωση της πρωτεΐνης p62 στους κλώνους που εμφανίζουν υψηλή κυτταροπλασματική κοκκίωση. Το εύρημα μας αυτό συμφωνεί με γεγονότα ενεργοποιημένης αυτοφαγίας και συνδέει τη ρετρομετάθεση SVA με τη μείωση της έκφρασης της p62 (*Εικ. 3.33*).

Η p62 προσδένει την LC3 και τα επίπεδά της μειώνονται απουσία θρεπτικών συστατικών. Η LC3-I είναι κυτταροπλασματική ενώ η LC3-II προκύπτει από σύνδεση της LC3-I με φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και εντοπίζεται σε μεμβρανικά κυστίδια περιορισμού και αυτοφαγοσώματα. Το ποσό της LC3-II σχετίζεται στενά με τον αριθμό των αυτοφαγοσωμάτων και αποτελεί δείκτη για τη δημιουργία τους. Η συσσώρευσή της θα μπορούσε να είναι ένας δείκτης καταστολής αυτοφαγίας. Ωστόσο, τα επίπεδά της μπορεί να αλλάξουν ανεξαρτήτως αυτοφαγίας. Έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός αυτοφαγίας υποβοηθά την καρκινογένεση (268) και πιθανώς αυτό εξηγεί τα αυξημένα ποσοστά LC3-II στα κύτταρα μάρτυρα A549. Ωστόσο, επειδή και η ίδια η LC3-II αναπόφευκτα αποδομείται από λυσοσωμικές υδρολάσες κατά τη διάρκεια αυτοφαγίας (269, 270), δημιουργεί πρόβλημα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων ειδικά όσο αφορά τους κλώνους στους οποίους παρατηρείται κυρίως η LC3-I ενώ η II χάνεται (*Εικ. 3.33*). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το ότι κατά τη διάρκεια μικρών διαστημάτων έλλειψης θρεπτικών συστατικών, έχουμε μείωση της LC3-I και αύξηση της LC3-II. Εάν οι στρεσογόνες συνθήκες συνεχιστούν για μεγαλύτερο χρονικό η LC3-II δεν ανιχνεύεται (269).

Η πρωτεΐνη S6 αποτελεί συστατικό της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας και για την ενεργοποίησή της απαιτείται φωσφορυλίωση κυρίως από την κινάση S6 (152). Η τελευταία ενεργοποιείται, μέσω mTOR, από μιτογόνα ερεθίσματα και προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση. Έπειτα από αναστολή της S6K καταστέλλεται η μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (268). Η απουσία φωσφορυλιωμένης S6 σε όλες τους κλώνους που εξετάστηκαν εξηγεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου που παρατηρήθηκε (Εικ. 3.33) και επαληθεύει την πεποίθηση ότι τα κύτταρα με αυξημένα ποσοστά ρετρομετάθεσης SVA διανύουν μια περίοδο με ενεργοποιημένο το μονοπάτι αυτοφαγίας σε μια απόπειρα να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους μέσω καταβολισμού (271).

4.5.3 *Αυξημένα γεγονότα ρετρομετάθεσης σχετίζονται με εμφάνιση ιδιοτήτων καρκινικών βλαστικών κυττάρων*

Ο κλώνος 11 A549 εμφάνισε ένα από τα υψηλότερα ποσοστά ρετρομετάθεσης που μετρήθηκαν, χωρίς την επίδραση άλλων εξωγενών παραγόντων. Συγκεκριμένα, το 49% των κυττάρων ήταν θετικά σε έκφραση EGFP σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα. Τα αυξημένα ρετρομεταθετικά γεγονότα, έχοντας υψηλό δυναμικό μεταλλαξιγένεσης, συνδέθηκαν με αλλαγές στον κυτταρικό φαινότυπο. Όπως φαίνεται στην *Εικ. 3.26*, τα κύτταρα σχημάτιζαν δομές οι οποίες ομοιάζαν με κυψελίδες πνεύμονα. Ο φαινότυπος αυτός διατηρούνταν ακόμη και μετά από θρυψινοποίηση ενώ περιφερικά των καθορισμένων δομών δημιουργούνταν σφαίρες που είχαν τη δυνατότητα να αποκολλώνται, να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα πρόσφυσης (anoikis) και να επαναπροσκολλώνται ακόμη και σε συνθήκες χαμηλής προσκόλλησης.

Οι σφαίρες χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση και των δύο επιτόπων του δείκτη CD133 (AC133 και 293C3) (*Εικ. 3.29*). Έχει βρεθεί ότι ο δείκτης CD133 συνδέεται με την ύπαρξη βλαστικών και καρκινικών βλαστικών κυττάρων (272). Ανιχνεύεται σε νευροεπιθηλιακά και αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ενώ έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του αυξάνεται σε κακοήθειες όπως το γλοίωμα, το μελάνωμα, το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του ήπατος, του παχέως εντέρου, των ωοθηκών και των πνευμόνων (204). Όσο αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, έχει βρεθεί ότι οι πληθυσμοί CD133+ έχουν ιδιότητες να εκκινούν τη δημιουργία όγκων (273). Αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει έναν λειτουργικό ρόλο για το CD133 και προτείνει ότι η

έκφρασή του σε συνδυασμό με το CD44 μπορεί να διατηρήσει τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων για αυτοανανέωση και πολλαπλασιασμό ενώ η απουσία του οδηγεί σε διαφοροποίηση (206, 274, 275). Είναι γνωστό ότι τα ογκογόνα κύτταρα στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα είναι ένας σπάνιος πληθυσμός από αδιαφοροποίητα κύτταρα που εκφράζουν CD133. Τα κύτταρα αυτά όταν ενεθούν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια δημιουργούν όγκους όπως ο αρχικός. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον σε πνευμονόσφαιρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό που περιέχει τους αυξητικούς παράγοντες EGF και bFGF. Τα θετικά σε ρετρομετάθεση SV40 κύτταρα στην περίπτωση μας δημιουργούν σφαίρες που αναπτύσσονται χωρίς την απαίτηση επιπλέον αυξητικών παραγόντων (276) και δημιουργούν εστίες που αυξάνονται σε μέγεθος σε μαλακό άγαρ, που δείχνει την επίπτωση της ρετρομετάθεσης σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (*Εικ. 3.31*).

Η σχέση μεταξύ καρκινικών κυττάρων, φυσιολογικών βλαστικών και καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι μέχρι και σήμερα ένα θέμα μεγάλου ενδιαφέροντος. Τα μεταγραφικά δίκτυα που είναι ενεργά σε φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα και προσδίδουν σε αυτά ιδιότητες όπως αυτοανανέωση, πλαστικότητα ή αυξημένη αντίσταση σε γενοτοξικό στρες, μπορεί να έχουν παρόμοια λειτουργία και σε καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως Oct4A, Nanog και Sox2, ως απόκριση σε βλάβες DNA, σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση και δημιουργία ανθεκτικών κυττάρων σε πολλούς τύπους καρκίνου (204, 277). Το Sox2 εμφανίζεται αυξημένο σε καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού (211, 212) όπως επίσης και στα βλαστικά-προγονικά κύτταρα πνεύμονα (209, 210). Επιπλέον, θεωρείται ως παράγοντας-κλειδί για την εξέλιξη της διαδικασίας της μορφογένεσης του πνεύμονα (278). Ο εντοπισμός και η χρονική στιγμή έκφρασής του είναι αυστηρά ελεγχόμενος και μειώνεται σε διαφοροποιημένα κύτταρα (279). Στα πειράματα RT-PCR δεν ανιχνεύτηκε μεταβολή στην έκφραση του Sox-2. Πιθανώς, η απομόνωση RNA από το σύνολο των κυττάρων του κλώνου και όχι αποκλειστικά από κύτταρα σφαιρών είχε ως αποτέλεσμα, τα μεταγραφήματα Sox-2, να υποεκπροσωπούνται στο συνολικό δείγμα.

Έχει βρεθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις καρκίνων, η έκφραση των Oct4 και Sox2 είναι ανεστραμμένη και ότι η υπερέκφραση του Sox2 προκαλεί μείωση της μεταγραφής του Oct4 (280). Στην παρούσα μελέτη, η μη μεταβολή του Sox2 συνοδεύθηκε από αυξημένη έκφραση του Oct-4 ενός μεταγραφικού παράγοντα που συσχετίζεται με την αδιαφοροποίητη πολυδύναμη κατάσταση των πληθυσμών

βλαστικών κυττάρων που προκύπτουν από ιστούς ενηλίκων (281). Έχει υποστηριχθεί ότι τα αδιαφοροποίητα κύτταρα στα οποία εκφράζεται το Oct-4 σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών (282) και γίνονται πιο επιθετικά (281), κάτι το οποίο επαληθεύεται και από το αυξημένο μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων του κλώνου 11.

4.6 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες & του αντικαρκινικού φαρμάκου Ετοποσίδιο στη ρετρομετάθεση του SVAS_{MOC1-L}

Για να μελετήσουμε το ρόλο του οξειδωτικού στρες στη ρετρομετάθεση του SVAS_{MOC1-L}, χρησιμοποιήσαμε διάλυμα μετα-αρσενικού νατρίου όπως επίσης και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό παράγει σταθερά H₂O₂ και σε αντίθεση με το διάλυμα υπεροξειδίου το οποίο είναι ασταθές (283) επιτρέπει τον ακριβή υπολογισμό των συγκεντρώσεων διευκολύνοντας την επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Και οι δύο παράγοντες οδήγησαν σε μεγάλη αύξηση των παρατηρούμενων γεγονότων ρετρομετάθεσης του SVA. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας η οποία απέδειξε για πρώτη φορά ότι τόσο το H₂O₂ όσο και το αρσενικό, επάγουν τη ρετρομετάθεση των VL30 σε κύτταρα NIH3T3 και συνδέονται ισχυρά με φαινόμενα κυτταροτοξικότητας (181, 284)

Χαρακτηριστικό σημείο της δράσης τόσο του αρσενικού όσο και του H₂O₂, είναι η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στο κύτταρο. Εξ ορισμού, η γένεση ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης απαιτεί ένα ρετροτρανσποζονιακό αντίγραφο και τη δράση μιας ομόλογης αντίστροφης μεταγραφάσης. Τα SVA δεν έχουν κωδικοποιό δυναμικό και έτσι είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα μεταγραφήματα που προκύπτουν από την κατασκευή μας είναι προσβάσιμα σε μια αντίστροφη μεταγραφάση που δρα *in trans*. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν ενδογενείς αντίστροφες μεταγραφάσες αυξάνει έπειτα από επίδραση σε κύτταρα παραγόντων που παράγουν ROS (285). Συνεπώς, οι παραγόμενες αντίστροφες μεταγραφάσες μπορεί να παρέχουν την κατάλληλη ενζυμική δραστηριότητα που απαιτείται για πραγματοποιηθεί η ρετρομετάθεση.

Είναι γνωστό πως οι δραστικές μορφές οξυγόνου οδηγούν σε βλάβη στις αζωτούχες βάσεις και κατά συνέπεια σε σχάσεις μονής αλλά και διπλής έλικας (286). Οι σχάσεις αυτές απαιτούνται για να πραγματοποιηθεί μια επιτυχημένη ενσωμάτωση ενός νέου ρετροτρανσποζονιακού αντιγράφου όπως προϋποθέτει ο μηχανισμός TPRT (Target Primed Reverse Transcription – αντίστροφη μεταγραφή πριμοδοτούμενη από αλληλουχία στόχο) και μπορεί να ευθύνονται και για τα αυξημένα ποσοστά ρετρομετάθεσης SVA που ανιχνεύονται. Είναι γνωστό πως στην περίπτωση των L1 ο προβλεπόμενος αριθμός επιτυχημένων ενσωματώσεων απαιτεί 10 με 100 φορές περισσότερες σχάσεις στο DNA (259). Επιπλέον, η παραγωγή ROS προκαλεί αύξηση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και NF-κB (287). Μετά από ανάλυση της αλληλουχίας του SVA με τον αλγόριθμο MatInspector, έχει βρεθεί ότι η περιοχή SINE-R διαθέτει θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB και συνεπώς η αύξησή του μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή SVA-μεταγράφων. Πιστεύουμε ότι η αύξηση της ρετρομετάθεσης SVA από ROS διαμεσολαβείται από τον NF-κB, αλλά παραμένει για λεπτομερέστερη μελέτη.

Τόσο το αρσενικό όσο και το H₂O₂ μέσω των βλαβών που δημιουργούν στο DNA οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (288). Τα αυξημένα γεγονότα κυτταροτοξικότητας οφείλονται τόσο σε σχάσεις του DNA που προκαλούν οι δύο παράγοντες, όπως προαναφέρθηκε (289, 290) όσο και στη συσσώρευση μεταλλάξεων εξαιτίας των αυξημένων ρετρομεταθετικών γεγονότων. Οι δύο παράγοντες επάγουν την πρόκληση ρετρομεταθετικών γεγονότων, κάτι το οποίο υποστηρίζεται από δύο σειρές ευρημάτων: κατά πρώτον η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξάνεται κατά δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο τρόπο, κατά δεύτερον τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα χαρακτηρίζονταν από έκφραση EGFP. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας το αντιοξειδωτικό NAC, παρατηρήσαμε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της επαγόμενης συχνότητας ρετρομετάθεσης γεγονός που επισημαίνει ότι η ρετρομετάθεση SVA επάγεται από ROS, ούσα εξαρτώμενη οξειδωσης (Εικ. 3.43). Η μείωση των ROS εξηγεί την αναστολή της ρετρομετάθεσης και τη μείωση της κυτταροτοξικότητας. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του αρσενικού, ενός εξαιρετικά επιβλαβούς παράγοντα μόλυνσης του περιβάλλοντος, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι μικρότερες από γνωστές περιπτώσεις περιβαλλοντικής επιμόλυνσης όπως για παράδειγμα τα 132μM στο Μπαγκλαντές ή την Αργεντινή αντίστοιχα (291). Με βάση τα παραπάνω πιστεύουμε ότι οι επιπτώσεις της περιβαλλοντικής επιμόλυνσης συσχετίζονται επιπλέον με την ρετρομετάθεση SVA.

Η αυξημένη ρετρομετάθεση του ρετροτρανσποζονίου SVA συσχετίζεται με αυξημένο ποσοστό κυττάρων στη φάση subG1 όσο και στη μετάβαση G2/M γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα για το ρετροτρανσποζόνιο VL30 (181, 284). Η επώαση με αρσενικό προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και κυτταροτοξικότητα (292). Επιπλέον, ένας πρόσφατα αναγνωρισμένος στόχος του H₂O₂ είναι η κινάση ATM η οποία προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και ενεργοποιείται υπό συγκεκριμένες συνθήκες στρες. Στην περίπτωση των πειραμάτων μας οι συνθήκες αυτές αφορούν σχάσεις στη διπλή έλικα του DNA που προκαλούνται τόσο από τα αυξημένα επίπεδα ROS όσο και από τα πολυάριθμα γεγονότα ρετρομεταθέσεων. Σε πρόσφατη έρευνα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου καταλύει τη δημιουργία διμερούς ATM δισουλφιδίου μέσω οξειδωσης ειδικών καταλοίπων κυστεΐνης στην ATM (293) οδηγώντας σε ενζυμική ενεργοποίηση. Τα κύτταρα στα οποία λείπει η κινάση ATM έχουν συνεχώς υψηλά επίπεδα ROS (294). Ο μηχανισμός με τον οποίο η ATM ρυθμίζει την ενδοκυτταρική κατάσταση οξειδωσης είναι πολύπλοκος και μπορεί να περιλαμβάνει τη ρύθμιση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων (295), το εξαρτώμενο από mTOR μονοπάτι αυτοφαγίας (296) ή τη σύνθεση του NADPH (297). Έτσι, Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ROS- ή αρσενικο-επαγόμενη ρετρομετάθεση SVA συσχετίζεται με την ATM και στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M.

Η έκθεση στο ετοποσίδιο που αποτελεί γενοτοξικό παράγοντα, οδηγεί σε αύξηση των ρετρομεταθετικών γεγονότων SVAS_{MOC1-L} σε ποσοστό 25.9% των κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το ετοποσίδιο αυξάνει τη μεταγραφή των τρανσποζονίων SINES και συνακόλουθα ενεργοποιεί μια ενδογενή αντίστροφη μεταγραφάση (298). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται νέα ρετρομεταθετικά αντίγραφα για ενσωμάτωση μέσω ενίσχυσης του μηχανισμού TPRT. Σε αυτό συμφωνούν πειράματα στα οποία έπειτα από επίδραση με ετοποσίδιο και κλωνοποίηση των ενθέσεων Alu με inverse PCR, όλες οι ενθέσεις έχουν επαναλήψεις της αλληλουχίας στόχου TATAA, κάτι που προτείνει ισχυρά την εμπλοκή των L1 (298). Είναι γνωστό ότι το ετοποσίδιο αυξάνει τη συγκέντρωση συμπλόκων τοποϊσομεράσης II-DNA πάνω από τα επιτρεπόμενα, για το κύτταρο, όρια (299). Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται μόνιμες σχάσεις διπλής έλικας οι οποίες αν βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό, εκκινούν μονοπάτια προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (300). Ωστόσο, το κύτταρο μπορεί να προβεί στη διόρθωση αυτών των σχάσεων μέσω διάφορων μονοπατιών, όπως ομόλογος ανασυνδυασμός,

μη ομόλογη ένωση άκρων κλπ (201). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προκύψουν γεγονότα διπλασιασμού, ελλείψεων ή μετατοπίσεων. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί το αυξημένο ποσοστό κυττάρων στη φάση G2/M. Υπολογίζεται ότι το 2-3% των ασθενών που λαμβάνουν ετοποσίδιο αναπτύσσουν δευτερογενείς κακοήθειες όπως λευχαιμίες που χαρακτηρίζονται από γεγονότα μετατοπίσεων.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αυξημένα γεγονότα ρетроμετάθεσης οδηγούν σε φαινόμενα ενθετικής μεταλλαξιγένεσης και υπογραμμίζουν το δυναμικό μετάλλαξης των παραγόντων αρσενικό, H₂O₂ και ετοποσίδιο που μπορεί να προάγουν την καρκινογένεση μέσω ρетроμετάθεσης SVA.

4.7 Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων στη ρетроμετάθεση του SVAS_{SMOC1-L}

Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την επιγενετική κατάσταση του γενώματος, έχουν σημαντική επίδραση στην κινητοποίηση των ρетроμεταθετών στοιχείων. Η επιγενετική αποσιώπηση καταστέλλει τη ρетроμετάθεση σε σωματικά κύτταρα και μπορεί να έχει μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική επίδραση σε περιοχές που βρίσκονται κοντά στο σημείο της ένθεσης. Αυτό μπορεί να προτείνει την ύπαρξη μιας δυναμικής δομής χρωματίνης στον γενετικό τόπο του SVA υπό συγκεκριμένο περιβάλλον. Εξετάσαμε τη δράση παραγόντων που οδηγούν είτε σε υπομεθυλίωση είτε σε ιστονική ακετυλίωση.

Η 5-αζακυτιδίνη αποτελεί αναστολέα της μεθυλομεταφοράσης-1. Βρήκαμε ότι οδηγεί σε αύξηση της ρетроμεταθετικής ενεργότητας των SVA ως και 6.5% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα, αύξηση του κυτταρικού θανάτου και της συγκέντρωσης κυττάρων στη φάση G2/M (Εικ. 3.39). Η κινητοποίηση των SVA σημειώνεται μετά από 3 ημέρες επώασης, κάτι που συμφωνεί με προηγούμενα πειράματα που ποσοτικοποιούν το συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης των CpG σε κύτταρα HCT116 και αναφέρουν πως τα ποσοστά μειώνονται μετά τις 48 ώρες (301).

Η αζακυτιδίνη επάγει γενωμική υπομεθυλίωση, δημιουργία σχάσεων διπλής έλικας και κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα A549 (121). Είναι γνωστό ότι στο γένωμα διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων, το 80% των νουκλεοτιδίων CpG που περιέχονται και σε ρетроτρανσποζόνια, είναι μεθυλιωμένο, διαδικασία που σχετίζεται τυπικά με μεταγραφική καταστολή και συνάδει με την αναγκαιότητα διατήρησης

γενωμικής σταθερότητας (302-304). Ωστόσο, το DNA των περισσότερων όγκων έχει μειωμένο περιεχόμενο μεθυλιωμένων καταλοίπων κυτοσίνης. Ένας σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών περιγράφουν την ενεργοποίηση των ρετροτρανσποζονίων στο πλαίσιο της απώλειας μεθυλίωσης. Ενδείξεις για υπομεθυλίωση ρετροτρανσποζονίων έχει παρατηρηθεί σε ηπατοκυτταρικό και καρκίνο του προστάτη, σε λεμφοβλαστικές λευχαιμίες κλπ (305). Η αφαίρεση «σημαδιών» επιγενετικής αποσιώπησης μπορεί να σχετίζεται με την παρατηρηθείσα υπομεθυλίωση των SVA σε περιπτώσεις καρκίνου. Έχει βρεθεί ότι σε περιπτώσεις όγκων και σε παρακείμενα κύτταρα, το πρότυπο μεθυλίωσής τους διαταράσσεται και μειώνεται (121).

Πλήθος μελετών, συσχετίζουν την ακετυλίωση των ιστονών με ευχρωματινοποίηση και επαγωγή της μεταγραφής (306). Αν και αυτό δεν αποτελεί απόλυτο κανόνα, η πειραματική επαγωγή ακετυλίωσης είτε μέσω υπερέκφρασης ακετυλομεταφορασών ή μέσω χημικής αναστολής τους, έχει αποδείξει ότι η ακετυλίωση μπορεί να επάγει τη μεταγραφή των ρετρομεταθετών στοιχείων, το πρώτο απαραίτητο βήμα για τη γένεση ενός ρετρομεταθετικού γεγονότος. Χρησιμοποιήσαμε δύο αναστολείς των ιστονικών αποακετυλασών, την Τριχοστατίνη A (αναστολέας των HDAC-I και II) και το Βαλπροϊκό οξύ (αναστολέας των HDAC-I). Ο ειδικός αναστολέας των ιστονικών αποακετυλασών, Τριχοστατίνη A, που προκαλεί ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4, οδήγησε σε δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των γεγονότων ρετρομετάθεσης των SVA μέχρι και 3.75 φορές στη συγκέντρωση των 600 nM σε σχέση με το μάρτυρα (*Εικ. 3.35*). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί τόσο με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας όπου η τριχοστατίνη επάγει τη μεταγραφή και τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30 (Markopoulos G, αδημοσίευτα αποτελέσματα) όσο και με αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων. Συγκεκριμένα, η τριχοστατίνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των τρανσποζονίων LINE-1 (307) σε πολλές κυτταρικές σειρές, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στις μελέτες αυτές είναι κατά πολύ αυξημένες σε σχέση με την παρούσα μελέτη και κυμαίνονται από 500nM ως 1μM (308).

Οι νέες ρετρομεταθέσεις που παράγονται και γίνονται επιτρεπτές λόγω των ιστονικών τροποποιήσεων, δημιουργούν βλάβες στο DNA κυρίως μέσω ενθετικής μεταλλαξιγένεσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα αυξανόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης κατά αναλογία με την αύξηση της συγκέντρωσης των ανωτέρω

ουσιών, οδηγούν ταυτόχρονα σε συσσώρευση των EGFP-θετικών κυττάρων στη φάση G2/M. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελεί μια μορφή άμυνας του κυττάρου στο αυξημένο φορτίο των μεταλλάξεων. Αύξηση στη συχνότητα ρετρομετάθεσης μέχρι και 2.7% στη μέγιστη συγκέντρωση των 7.5mM παρατηρείται και με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βαλπροϊκού οξέος που δε συνοδεύεται από αλλαγή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Συνοπτικά, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, απομονώθηκε από το γένομα ενός ασθενούς ένα ρετρομεταθετό στοιχείο SVA που χαρακτηρίζεται από έλλειψη τμήματος της συνιστώσας VNTR. Το SVA_{SMOC1-L} ρετρομετατίθεται με μεγάλη συχνότητα ακόμη και απουσία εξωγενών ερεθισμάτων και χωρίς να έχει κλωνοποιηθεί καθοδικά κάποιου ισχυρού υποκινητή που θα οδηγούσε την μεταγραφική του έκφραση. Τίθεται εύλογα το ερώτημα: η κινητοποίηση του SVA_{SMOC1-L} προηγήθηκε ως αίτιο της λευχαιμίας ή η ρετρομετάθεσή του προκλήθηκε από την ασθένεια; Παρόλο που η παρούσα μελέτη δε μπορεί να δώσει σαφή απάντηση στο ερώτημα αυτό, είναι γεγονός πως η αυξημένη γενωμική αστάθεια που χαρακτηρίζει τις καρκινικές αλλά και τις προ-καρκινικές καταστάσεις, αποτελεί πλήγμα στην ομοιόσταση του κυττάρου. Δημιουργείται, έτσι, ένα περιβάλλον που ευνοεί μεταλλαξιγόνα γεγονότα (σημειακές μεταλλάξεις, μετατοπίσεις, ελλείψεις) τα οποία είτε συνιστούν τροχοπέδη στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ή του προσδίδουν πλεονέκτημα κάνοντάς το πιο ανθεκτικό και επιθετικό. Πιστεύουμε πως η απώλεια τμήματος του SVA_{SMOC1-L} προέκυψε από κάποιο «τυχαίο» γεγονός έλλειψης ή ανασυνδυασμού που είχε ως αποτέλεσμα την κινητοποίησή του και αύξησε ακόμη περισσότερο τον αριθμό των μεταλλάξεων και την επιθετικότητα των λευχαιμικών κυττάρων. Σαφώς, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση ώστε να φωτίσουν το ρόλο των ρετρομεταθετών στοιχείων στην πρόκληση/εξέλιξη του λευχαιμικού φαινοτύπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα σύνθετα ρετροτρανσποζόνια SVA (SINE-R, VNTR, Alu) αποτελούν την εξελικτικά νεότερη οικογένεια σύνθετων ρετρομεταθετών στοιχείων στο ανθρώπινο γένωμα. Απαντώνται σε ~2670 αντίγραφα και ενοχοποιούνται για την πρόκληση γενετικών ασθενειών (πχ. λευχαιμία, νευροϊνωμάτωση κλπ) με διάφορους μηχανισμούς. Έχει υποστηριχθεί ότι κινητοποιούνται από την πρωτεΐνη ORF2 των LINE-1 ωστόσο η μεταγραφική τους ρύθμιση παραμένει άγνωστη σε μεγάλο βαθμό.

Στην παρούσα μελέτη ανακτήθηκαν, αρχικά, τα πλήρους μήκους SVA του ανθρώπινου γενώματος μέσω της βάσης δεδομένων UCSC. Έγινε κατηγοριοποίηση ανάλογα με τη γενωμική τους θέση και βρέθηκε ότι σχεδόν το σύνολο των SVA εδράζονται παρακείμενα στη θέση έναρξης της μεταγραφής ή εντός γονιδίων. Με στόχο την απομόνωση ενός ενεργού SVA, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές και κλωνοποιήθηκαν μεταγραφήματα SVA από κύτταρα λευχαιμικού ασθενούς. Μέσω νουκλεοτιδικής σύγκρισης (BLAST-NCBI) αποδείχτηκε η ομολογία με ακολουθίες SVA οι οποίες και χαρτογραφήθηκαν στο ανθρώπινο γένωμα. Χρησιμοποιώντας DNA από βλάστες ενός ασθενή με οξεία Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία κλωνοποιήθηκε το SVA-C που εδράζεται στο 1^ο ιντρόνιο του γονιδίου SMOC-1 (SVA_{SMOC1-L}). Ωστόσο αυτό χαρακτηρίστηκε από έλλειψη 347 νουκλεοτιδίων στην περιοχή VNTR σε σχέση με το αντίστοιχο SVA στο γονιδίωμα αναφοράς.

Το SVA_{SMOC1-L} σημάνθηκε με ειδική κασέτα ανίχνευσης ρετρομετάθεσης που εξασφαλίζει την έκφραση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP αποκλειστικά και μόνο, έπειτα από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης (SVA/EGFP-INT). Μετά από διαμόλυνση και ανάλυση FACS σε κυτταρικούς κλώνους βρέθηκε ότι τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα αποτελούσαν το 0.1-32% του συνόλου σε μαζικούς και μονήρεις κλώνους A549, το 0.5-4.8% σε μαζικούς και μονήρεις κλώνους HeLa και το 4.7-6.3% σε μαζικούς κλώνους H1299. Διαμόλυνση σε κύτταρα HUT-78 και Jurkat απέδωσε συχνότητες ρετρομετάθεσης 31.7- και 70.8%, αντίστοιχα. Τα γεγονότα ρετρομετάθεσης ανιχνεύθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις μέσω EGFP-θετικών κυττάρων με μικροσκοπία UV, τα οποία περαιτέρω πιστοποιήθηκαν ως γενωμικές ενσωματώσεις με ανάλυση PCR. Τα αυξημένα γεγονότα ρετρομετάθεσης συσχετίστηκαν σε κύτταρα A549 με αλλαγή φαινοτύπου, φαινόμενα αυτοφαγίας, απόκτηση διηθητικότητας και ιδιοτήτων βλαστικών κυττάρων. Σε κύτταρα κλώνων A549, βρέθηκε ότι το SVA_{SMOC1-L} μπορεί να κινητοποιηθεί από: **α.** την αντίστροφη

μεταγραφάση ORF2 των LINE-1, **β.** αναστολείς των αποακετυλασών (Τριχοστατίνη-Α και βαλπροϊκό οξύ), **γ.** το αντικαρκινικό φάρμακο Ετοποσίδιο και **δ.** επαγόμενο οξειδωτικό στρες από υπεροξείδιο του υδρογόνου και αρσενικό.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν πειραματικά για πρώτη φορά ότι: **1.** ένα VNTR-ελλειμματικό ρετροτρανσποζόνιο SVA είναι ρετρομεταθετικά ενεργό, **2.** πολλαπλασιαστικά ενεργά κύτταρα, όπως τα καρκινικά, παρέχουν τις προϋποθέσεις για την τέλεση γεγονότων ρετρομετάθεσης και **3.** ένα SVA με υψηλό δυναμικό ρετρομετάθεσης, μπορεί να συμβάλλει στην κακοήγη εξέλιξη της λευχαιμίας.

ABSTRACT

Composite retrotransposons SVA (SINE-R, VNTR, Alu) are the evolutionarily youngest family of complex retrotransposons in hominoids. They are present in ~ 2670 copies in the human genome reference sequence and have been implicated in causing genetic diseases (Leukemia, neurofibromatosis etc) through various mechanisms. It has been suggested that they are mobilized by the ORF2 LINE-1 protein whereas their transcriptional regulation remains highly obscured.

In the present study, we recovered the full-length SVAs of the human genome using UCSC database. Following categorization according to their genomic location, we found that the vast majority of SVAs are adjacent to the transcription start site, or within genes. In order to isolate an active SVA, specific primers were designed and used to clone SVA transcripts from leukemic cells. Nucleotide comparison (BLAST-NCBI) proved the homology with SVA elements and cloned sequences were mapped to the human genome. DNA was extracted from blast cells of a patient with acute B-lymphoblastic leukemia and an SVA-C, residing in the first intron of the SMOC-1 gene (SVA_{SMOC1-L}) was cloned. Remarkably, it was characterized by a 347 nucleotide truncation in the VNTR region compared to the corresponding reference SVA in the human genome.

SVA_{SMOC1-L} was labeled with an EGFP-based retrotransposition cassette (SVA/EGFP-INT), designed to detect EGFP expression solely upon the occurrence of an SVA retrotransposition event. Following transfection and FACS analysis of cell clones, we found that retrotranspositionally positive cells were 0.1-32% of total cells in A549 single and massive clone cells, 0.5-4.8% in massive and single HeLa clones, and 4.7-6.3% in H1299 massive clones. Transfection of HUT-78 and Jurkat cells resulted in high retrotransposition frequencies reaching 31.7- and 70.8%, respectively. Retrotransposition events were detected in most cases by means of EGFP-positive cells by UV microscopy and further identified as genomic insertions by PCR analysis. Elevated retrotransposition events were associated with phenotypic changes, autophagic phenomena, acquisition of invasiveness and stem cell properties in A549 cells. In A549 clone cells, SVA_{SMOC1-L} was mobilized by: **a.** ORF2-LINE-1 reverse transcriptase, **b.** deacetylase inhibitors (Trichostatin-A, valproic acid), **c.** the anti-cancer drug Etoposide and **d.** induced oxidative stress by hydrogen peroxide and arsenic.

The results of this study demonstrate for the first time that: **1.** a VNTR-truncated SVA retrotransposon is active, **2.** proliferating cells, such as cancer cells, provide an amenable environment for generation of retrotransposition events and **3.** an SVA with a high retrotransposition-potential may contribute to the malignant progression of leukemia.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*. 1980 Apr 17;284(5757):604-7.
2. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984 Nov 16;226(4676):792-801.
3. Fedoroff N. How jumping genes were discovered. *Nat Struct Biol*. 2001 Apr;8(4):300-1.
4. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
5. de Koning AP, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet*. 2011 Dec;7(12):e1002384.
6. Hancks DC, Kazazian HH, Jr. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA*. 2016;7:9.
7. Goodier JL, Kazazian HH, Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):23-35.
8. Griffiths DJ. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol*. 2001;2(6):REVIEWS1017.
9. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HH, Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Dec;13(6):651-8.
10. Kazazian HH, Jr. Mobile elements and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Jun;8(3):343-50.
11. Moyes D, Griffiths DJ, Venables PJ. Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease. *Trends Genet*. 2007 Jul;23(7):326-33.
12. Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Sep;79(18):5503-7.
13. Mills RE, Bennett EA, Iskow RC, Devine SE. Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet*. 2007 Apr;23(4):183-91.
14. Eickbush TH, Jamburuthugoda VK. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res*. 2008 Jun;134(1-2):221-34.
15. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*. 2001;35:501-38.
16. Kazazian HH, Jr., Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*. 1988 Mar 10;332(6160):164-6.
17. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5280-5.
18. Alisch RS, Garcia-Perez JL, Muotri AR, Gage FH, Moran JV. Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev*. 2006 Jan 15;20(2):210-24.
19. Martin SL. The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(1):45621.
20. Kulpa DA, Moran JV. Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Jul;13(7):655-60.

21. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet.* 2009 Oct;10(10):691-703.
22. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res.* 2008 Mar;18(3):343-58.
23. Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J.* 2002 Nov 1;21(21):5899-910.
24. Jurka J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 4;94(5):1872-7.
25. Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, Ichiyanagi K, Adachi N, Koyama H, et al. Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet.* 2009 Apr;5(4):e1000461.
26. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Jr., Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell.* 1996 Nov 29;87(5):905-16.
27. Burns KH, Boeke JD. Human transposon tectonics. *Cell.* 2012 May 11;149(4):740-52.
28. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H. Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 28;103(9):3220-5.
29. Rubin CM, Kimura RH, Schmid CW. Selective stimulation of translational expression by Alu RNA. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3253-61.
30. Liu WM, Chu WM, Choudary PV, Schmid CW. Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic Acids Res.* 1995 May 25;23(10):1758-65.
31. Wang H, Xing J, Grover D, Hedges DJ, Han K, Walker JA, et al. SVA elements: a hominid-specific retroposon family. *J Mol Biol.* 2005 Dec 9;354(4):994-1007.
32. Savage AL, Bubb VJ, Breen G, Quinn JP. Characterisation of the potential function of SVA retrotransposons to modulate gene expression patterns. *BMC Evol Biol.* 2013;13:101.
33. Shen L, Wu LC, Sanlioglu S, Chen R, Mendoza AR, Dangel AW, et al. Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *J Biol Chem.* 1994 Mar 18;269(11):8466-76.
34. Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1444-51.
35. Damert A, Raiz J, Horn AV, Lower J, Wang H, Xing J, et al. 5'-Transducing SVA retrotransposon groups spread efficiently throughout the human genome. *Genome Res.* 2009 Nov;19(11):1992-2008.
36. Bennett EA, Coleman LE, Tsui C, Pittard WS, Devine SE. Natural genetic variation caused by transposable elements in humans. *Genetics.* 2004 Oct;168(2):933-51.
37. Hancks DC, Ewing AD, Chen JE, Tokunaga K, Kazazian HH, Jr. Exon-trapping mediated by the human retrotransposon SVA. *Genome Res.* 2009 Nov;19(11):1983-91.

38. Bantysh OB, Buzdin AA. Novel family of human transposable elements formed due to fusion of the first exon of gene MAST2 with retrotransposon SVA. *Biochemistry (Mosc)*. 2009 Dec;74(12):1393-9.
39. Zabolotneva AA, Bantysh O, Suntsova MV, Efimova N, Malakhova GV, Schumann GG, et al. Transcriptional regulation of human-specific SVA(1) retrotransposons by cis-regulatory MAST2 sequences. *Gene*. 2012 Aug 15;505(1):128-36.
40. Norris J, Fan D, Aleman C, Marks JR, Futreal PA, Wiseman RW, et al. Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers. *J Biol Chem*. 1995 Sep 29;270(39):22777-82.
41. Han K, Konkel MK, Xing J, Wang H, Lee J, Meyer TJ, et al. Mobile DNA in Old World monkeys: a glimpse through the rhesus macaque genome. *Science*. 2007 Apr 13;316(5822):238-40.
42. Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res*. 2005;110(1-4):462-7.
43. Kim HS, Wadekar RV, Takenaka O, Hyun BH, Crow TJ. Phylogenetic analysis of a retroposon family in african great apes. *J Mol Evol*. 1999 Nov;49(5):699-702.
44. van de Lagemaat LN, Medstrand P, Mager DL. Multiple effects govern endogenous retrovirus survival patterns in human gene introns. *Genome Biol*. 2006;7(9):R86.
45. Georgiou I, Noutsopoulos D, Dimitriadou E, Markopoulos G, Apergi A, Lazaros L, et al. Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Hum Mol Genet*. 2009 Apr 1;18(7):1221-8.
46. Xing J, Wang H, Belancio VP, Cordaux R, Deininger PL, Batzer MA. Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 21;103(47):17608-13.
47. Hassoun H, Coetzer TL, Vassiliadis JN, Sahr KE, Maalouf GJ, Saad ST, et al. A novel mobile element inserted in the alpha spectrin gene: spectrin dayton. A truncated alpha spectrin associated with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):643-8.
48. Hancks DC, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH, Jr. The minimal active human SVA retrotransposon requires only the 5'-hexamer and Alu-like domains. *Mol Cell Biol*. 2012 Nov;32(22):4718-26.
49. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem*. 1996 Jun 14;271(24):14412-20.
50. Raiz J, Damert A, Chira S, Held U, Klawitter S, Hamdorf M, et al. The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery. *Nucleic Acids Res*. 2012 Feb;40(4):1666-83.
51. Hancks DC, Goodier JL, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH, Jr. Retrotransposition of marked SVA elements by human L1s in cultured cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep 1;20(17):3386-400.
52. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res*. 2001 Dec;11(12):2059-65.

53. Szak ST, Pickeral OK, Makalowski W, Boguski MS, Landsman D, Boeke JD. Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol.* 2002 Sep 19;3(10):research0052.
54. Goodier JL, Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 1;9(4):653-7.
55. Pickeral OK, Makalowski W, Boguski MS, Boeke JD. Frequent human genomic DNA transduction driven by LINE-1 retrotransposition. *Genome Res.* 2000 Apr;10(4):411-5.
56. Goodier JL, Mandal PK, Zhang L, Kazazian HH, Jr. Discrete subcellular partitioning of human retrotransposon RNAs despite a common mechanism of genome insertion. *Hum Mol Genet.* 2010 May 1;19(9):1712-25.
57. Singer T, McConnell MJ, Marchetto MC, Coufal NG, Gage FH. LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci.* 2010 Aug;33(8):345-54.
58. Boeke JD. LINEs and Alus--the polyA connection. *Nat Genet.* 1997 May;16(1):6-7.
59. Bennett EA, Keller H, Mills RE, Schmidt S, Moran JV, Weichenrieder O, et al. Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Res.* 2008 Dec;18(12):1875-83.
60. Buzdin A, Gogvadze E, Lebrun MH. Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification. *FEBS Lett.* 2007 Jun 26;581(16):2877-82.
61. Garcia-Perez JL, Doucet AJ, Bucheton A, Moran JV, Gilbert N. Distinct mechanisms for trans-mediated mobilization of cellular RNAs by the LINE-1 reverse transcriptase. *Genome Res.* 2007 May;17(5):602-11.
62. Kamal M, Xie X, Lander ES. A large family of ancient repeat elements in the human genome is under strong selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103(8):2740-5.
63. Beck CR, Collier P, Macfarlane C, Malig M, Kidd JM, Eichler EE, et al. LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1159-70.
64. Huang CR, Schneider AM, Lu Y, Niranjana T, Shen P, Robinson MA, et al. Mobile interspersed repeats are major structural variants in the human genome. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1171-82.
65. Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, Neuwald AF, et al. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1253-61.
66. Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, 3rd, et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science.* 2012 Aug 24;337(6097):967-71.
67. Witherspoon DJ, Zhang Y, Xing J, Watkins WS, Ha H, Batzer MA, et al. Mobile element scanning (ME-Scan) identifies thousands of novel Alu insertions in diverse human populations. *Genome Res.* 2013 Jul;23(7):1170-81.
68. Hancks DC, Kazazian HH, Jr. Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Jun;22(3):191-203.
69. Cordaux R, Hedges DJ, Herke SW, Batzer MA. Estimating the retrotransposition rate of human Alu elements. *Gene.* 2006 May 24;373:134-7.
70. Jackson K, Yu MC, Arakawa K, Fiala E, Youn B, Fiegl H, et al. DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2004 Dec;3(12):1225-31.

71. Macfarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, Lettieri K, Rowe HM, Bonanomi D, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*. 2012 Jul 5;487(7405):57-63.
72. Macfarlan TS, Gifford WD, Agarwal S, Driscoll S, Lettieri K, Wang J, et al. Endogenous retroviruses and neighboring genes are coordinately repressed by LSD1/KDM1A. *Genes Dev*. 2011 Mar 15;25(6):594-607.
73. Hancks DC, Kazazian HH, Jr. SVA retrotransposons: Evolution and genetic instability. *Semin Cancer Biol*. 2010 Aug;20(4):234-45.
74. Clark DW, Phang T, Edwards MG, Geraci MW, Gillespie MN. Promoter G-quadruplex sequences are targets for base oxidation and strand cleavage during hypoxia-induced transcription. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jul 1;53(1):51-9.
75. den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, et al. Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet*. 1999 Oct;23(2):217-21.
76. Teugels E, De Brakeleer S, Goelen G, Lissens W, Sermijn E, De Greve J. De novo Alu element insertions targeted to a sequence common to the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat*. 2005 Sep;26(3):284.
77. Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, et al. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res*. 1992 Feb 1;52(3):643-5.
78. Morse B, Rotherg PG, South VJ, Spandorfer JM, Astrin SM. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature*. 1988 May 5;333(6168):87-90.
79. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(6):1973-85.
80. Matlik K, Redik K, Speek M. L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(1):71753.
81. Thomson SJ, Goh FG, Banks H, Krausgruber T, Kotenko SV, Foxwell BM, et al. The role of transposable elements in the regulation of IFN-lambda1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 14;106(28):11564-9.
82. Nigumann P, Redik K, Matlik K, Speek M. Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics*. 2002 May;79(5):628-34.
83. Laperriere D, Wang TT, White JH, Mader S. Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution. *BMC Genomics*. 2007;8:23.
84. Sorek R, Ast G, Graur D. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res*. 2002 Jul;12(7):1060-7.
85. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(5):1512-21.
86. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger P. The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene*. 2008 Mar 31;411(1-2):38-45.
87. Perepelitsa-Belancio V, Deininger P. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat Genet*. 2003 Dec;35(4):363-6.
88. Kim DD, Kim TT, Walsh T, Kobayashi Y, Matise TC, Buyske S, et al. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome Res*. 2004 Sep;14(9):1719-25.
89. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097-101.

90. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Nakagawa I, Matsuzaki J, Kanai Y, et al. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene*. 2009 Jul 30;28(30):2738-44.
91. Chen LL, DeCerbo JN, Carmichael GG. Alu element-mediated gene silencing. *EMBO J*. 2008 Jun 18;27(12):1694-705.
92. Chen C, Ara T, Gautheret D. Using Alu elements as polyadenylation sites: A case of retroposon exaptation. *Mol Biol Evol*. 2009 Feb;26(2):327-34.
93. Conley AB, Piriyaongsa J, Jordan IK. Retroviral promoters in the human genome. *Bioinformatics*. 2008 Jul 15;24(14):1563-7.
94. Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO, Wani S, Plessy C, Irvine KM, et al. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):563-71.
95. van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet*. 2003 Oct;19(10):530-6.
96. Yang Z, Boffelli D, Boonmark N, Schwartz K, Lawn R. Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J Biol Chem*. 1998 Jan 9;273(2):891-7.
97. Hambor JE, Mennone J, Coon ME, Hanke JH, Kavathas P. Identification and characterization of an Alu-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 alpha gene. *Mol Cell Biol*. 1993 Nov;13(11):7056-70.
98. Medstrand P, van de Lagemaat LN, Mager DL. Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genome Res*. 2002 Oct;12(10):1483-95.
99. Copeland CS, Mann VH, Brindley PJ. Both sense and antisense strands of the LTR of the *Schistosoma mansoni* Pao-like retrotransposon Sinbad drive luciferase expression. *Mol Genet Genomics*. 2007 Feb;277(2):161-70.
100. Domansky AN, Kopantzev EP, Snezhkov EV, Lebedev YB, Leib-Mosch C, Sverdlov ED. Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *FEBS Lett*. 2000 Apr 28;472(2-3):191-5.
101. Dunn CA, Romanish MT, Gutierrez LE, van de Lagemaat LN, Mager DL. Transcription of two human genes from a bidirectional endogenous retrovirus promoter. *Gene*. 2006 Feb 1;366(2):335-42.
102. Feuchter A, Mager D. Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers. *Nucleic Acids Res*. 1990 Mar 11;18(5):1261-70.
103. Huh JW, Kim DS, Kang DW, Ha HS, Ahn K, Noh YN, et al. Transcriptional regulation of GSDML gene by antisense-oriented HERV-H LTR element. *Arch Virol*. 2008;153(6):1201-5.
104. Conley AB, Miller WJ, Jordan IK. Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends Genet*. 2008 Feb;24(2):53-6.
105. Galante PA, Vidal DO, de Souza JE, Camargo AA, de Souza SJ. Sense-antisense pairs in mammals: functional and evolutionary considerations. *Genome Biol*. 2007;8(3):R40.
106. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*. 2007 Apr;8(4):272-85.
107. Sen SK, Han K, Wang J, Lee J, Wang H, Callinan PA, et al. Human genomic deletions mediated by recombination between Alu elements. *Am J Hum Genet*. 2006 Jul;79(1):41-53.

108. Lin L, Shen S, Tye A, Cai JJ, Jiang P, Davidson BL, et al. Diverse splicing patterns of exonized Alu elements in human tissues. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000225.
109. Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet.* 1994 Jun;10(6):188-93.
110. Wheelan SJ, Aizawa Y, Han JS, Boeke JD. Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution. *Genome Res.* 2005 Aug;15(8):1073-8.
111. Lee JY, Ji Z, Tian B. Phylogenetic analysis of mRNA polyadenylation sites reveals a role of transposable elements in evolution of the 3'-end of genes. *Nucleic Acids Res.* 2008 Oct;36(17):5581-90.
112. Xing J, Zhang Y, Han K, Salem AH, Sen SK, Huff CD, et al. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res.* 2009 Sep;19(9):1516-26.
113. Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol.* 2004 Aug;22(8):1001-5.
114. Makalowski W. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. *Gene.* 2000 Dec 23;259(1-2):61-7.
115. Song M, Boissinot S. Selection against LINE-1 retrotransposons results principally from their ability to mediate ectopic recombination. *Gene.* 2007 Apr 1;390(1-2):206-13.
116. Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, et al. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet.* 2002 Jun;31(2):159-65.
117. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger PL. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2010 Aug;20(4):200-10.
118. Moran JV, DeBerardinis RJ, Kazazian HH, Jr. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science.* 1999 Mar 5;283(5407):1530-4.
119. Brosius J. Genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences. *Genetica.* 1999;107(1-3):209-38.
120. Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, Perlman E, Flam F, Frieman MB, et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res.* 2002 Apr;12(4):543-54.
121. Szpakowski S, Sun X, Lage JM, Dyer A, Rubinstein J, Kowalski D, et al. Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements. *Gene.* 2009 Dec 15;448(2):151-67.
122. Conley ME, Partain JD, Norland SM, Shurtleff SA, Kazazian HH, Jr. Two independent retrotransposon insertions at the same site within the coding region of BTK. *Hum Mutat.* 2005 Mar;25(3):324-5.
123. van der Klift HM, Tops CM, Hes FJ, Devilee P, Wijnen JT. Insertion of an SVA element, a nonautonomous retrotransposon, in PMS2 intron 7 as a novel cause of Lynch syndrome. *Hum Mutat.* 2012 Jul;33(7):1051-5.
124. Takasu M, Hayashi R, Maruya E, Ota M, Imura K, Kougo K, et al. Deletion of entire HLA-A gene accompanied by an insertion of a retrotransposon. *Tissue Antigens.* 2007 Aug;70(2):144-50.
125. Legoix P, Sarkissian HD, Cazes L, Giraud S, Sor F, Rouleau GA, et al. Molecular characterization of germline NF2 gene rearrangements. *Genomics.* 2000 Apr 1;65(1):62-6.

126. Wilund KR, Yi M, Campagna F, Arca M, Zuliani G, Fellin R, et al. Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet.* 2002 Nov 15;11(24):3019-30.
127. Nakamura Y, Murata M, Takagi Y, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, et al. SVA retrotransposition in exon 6 of the coagulation factor IX gene causing severe hemophilia B. *Int J Hematol.* 2015 Mar 5.
128. Stacey SN, Kehr B, Gudmundsson J, Zink F, Jonasdottir A, Gudjonsson SA, et al. Insertion of an SVA-E retrotransposon into the CASP8 gene is associated with protection against prostate cancer. *Hum Mol Genet.* 2016 Jan 5.
129. Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, et al. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet.* 2007 Mar;80(3):393-406.
130. Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, et al. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature.* 2011 Oct 6;478(7367):127-31.
131. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature.* 2004 Sep 2;431(7004):96-9.
132. Chiu YL, Greene WC. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:317-53.
133. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science.* 2007 Nov 2;318(5851):761-4.
134. O'Donnell KA, Burns KH. Mobilizing diversity: transposable element insertions in genetic variation and disease. *Mob DNA.* 2010;1(1):21.
135. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9762-70.
136. Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol.* 2010 Dec;32(4):397-413.
137. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science.* 2010 Dec 3;330(6009):1344-8.
138. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102-9.
139. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 2011 Jul;7(7):673-82.
140. Li W, Yang Q, Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Mar;68(5):749-63.
141. Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):113-9.
142. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature.* 2009 Oct 1;461(7264):654-8.
143. Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett.* 2009 Jun 18;278(2):130-8.
144. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501.
145. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):735-40.

146. Martin P, Diaz-Meco MT, Moscat J. The signaling adapter p62 is an important mediator of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation. *EMBO J*. 2006 Aug 9;25(15):3524-33.
147. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):255-63.
148. Kuusisto E, Salminen A, Alafuzoff I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport*. 2001 Jul 20;12(10):2085-90.
149. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1069-75.
150. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24131-45.
151. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):603-14.
152. Volarevic S, Thomas G. Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;65:101-27.
153. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*. 2012 Jan 1;441(1):1-21.
154. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):596-603.
155. Meyuhas O, Dreazen A. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009;90:109-53.
156. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):307-18.
157. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):21-35.
158. Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006 Jun 30;312(5782):1882-3.
159. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Mar-Apr;8(3-4):243-70.
160. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE*. 2000 Oct 10;2000(53):pe1.
161. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 1995 Oct 13;270(5234):296-9.
162. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000 Jun 1;108(8):652-9.
163. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 20;102(38):13604-9.
164. Go YM, Gipp JJ, Mulcahy RT, Jones DP. H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5837-45.

165. Jin N, Hatton ND, Harrington MA, Xia X, Larsen SH, Rhoades RA. H₂O₂-induced egr-1, fra-1, and c-jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2000 Oct 15;29(8):736-46.
166. Kaltschmidt B, Sparna T, Kaltschmidt C. Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 1999 Summer;1(2):129-44.
167. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):323-33.
168. Chou YT, Lee CC, Hsiao SH, Lin SE, Lin SC, Chung CH, et al. The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer. *Stem Cells*. 2013 Dec;31(12):2607-19.
169. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May;24(5):981-90.
170. Brown LM, Pottern LM, Blot WJ. Lung cancer in relation to environmental pollutants emitted from industrial sources. *Environ Res*. 1984 Aug;34(2):250-61.
171. Knobeloch LM, Zierold KM, Anderson HA. Association of arsenic-contaminated drinking-water with prevalence of skin cancer in Wisconsin's Fox River Valley. *J Health Popul Nutr*. 2006 Jun;24(2):206-13.
172. Waalkes MP, Ward JM, Diwan BA. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis*. 2004 Jan;25(1):133-41.
173. Chowdhury R, Chatterjee R, Giri AK, Mandal C, Chaudhuri K. Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, Erk signaling and CyclinA expression. *Toxicol Lett*. 2010 Oct 5;198(2):263-71.
174. Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, Hamilton JW. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol Sci*. 2007 Jul;98(1):75-86.
175. Dong JT, Luo XM. Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res*. 1993 Jun;302(2):97-102.
176. Li G, Lee LS, Li M, Tsao SW, Chiu JF. Molecular changes during arsenic-induced cell transformation. *J Cell Physiol*. 2011 Dec;226(12):3225-32.
177. Liu LZ, Jiang Y, Carpenter RL, Jing Y, Peiper SC, Jiang BH. Role and mechanism of arsenic in regulating angiogenesis. *PLoS One*. 2011;6(6):e20858.
178. Ying S, Myers K, Bottomley S, Helleday T, Bryant HE. BRCA2-dependent homologous recombination is required for repair of Arsenite-induced replication lesions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2009 Aug;37(15):5105-13.
179. Wang H, Cao F, Li J, Li L, Li Y, Shi C, et al. Arsenic trioxide and mannitol for the treatment of acute promyelocytic leukemia relapse in the central nervous system. *Blood*. 2014 Sep 18;124(12):1998-2000.
180. Bode AM, Dong Z. The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Apr;42(1):5-24.
181. Markopoulos G, Noutsopoulos D, Mantziou S, Vartholomatos G, Monokrousos N, Angelidis C, et al. Arsenic induces VL30 retrotransposition: the involvement of oxidative stress and heat-shock protein 70. *Toxicol Sci*. 2013 Aug;134(2):312-22.

182. Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2004 Jan;255(1-2):67-78.
183. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004 Dec 15;37(12):1921-42.
184. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays.* 1998 Aug;20(8):615-26.
185. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002 May 15;20(10):2429-40.
186. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 2006 Apr 15;106(8):1794-803.
187. Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Nov;81(22):6993-7.
188. Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol Cancer Res.* 2004 Jan;2(1):62-72.
189. Jones PA, Taylor SM. Cellular-Differentiation, Cytidine Analogs and DNA Methylation. *Cell.* 1980;20(1):85-93.
190. Haaf T. The Effects of 5-Azacytidine and 5-Azadeoxycytidine on Chromosome Structure and Function - Implications for Methylation-Associated Cellular Processes. *Pharmacol Therapeut.* 1995;65(1):19-46.
191. Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW, Liang G, Yang AS, et al. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther.* 2005 Oct;4(10):1515-20.
192. Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2006 Mar 1;66(5):2794-800.
193. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jan;5(1):37-50.
194. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol.* 2003 Oct;109(1):80-8.
195. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002 Aug 12;21(35):5427-40.
196. Kim HR, Kim EJ, Yang SH, Jeong ET, Park C, Lee JH, et al. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway? *Exp Mol Med.* 2006 Dec 31;38(6):616-24.
197. Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. *Therapie.* 1963 Mar-Apr;18:435-8.
198. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3815-22.
199. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2008 May;34(3):206-22.

200. van Maanen JM, Retel J, de Vries J, Pinedo HM. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst.* 1988 Dec 7;80(19):1526-33.
201. Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005 Jul;5(4):363-72.
202. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
203. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):822-9.
204. Iida H, Suzuki M, Goitsuka R, Ueno H. Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *Int J Oncol.* 2012 Jan;40(1):71-9.
205. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Apr;19(2):150-8.
206. Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008 Jan;214(1):3-9.
207. Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development.* 2008 May;135(9):1575-87.
208. Chen X, Vega VB, Ng HH. Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:203-9.
209. Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Wert SE, Keiser AR, Smith AN, et al. Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells. *PLoS One.* 2009;4(12):e8248.
210. Que J, Luo X, Schwartz RJ, Hogan BL. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development.* 2009 Jun;136(11):1899-907.
211. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):17969-78.
212. Sholl LM, Long KB, Hornick JL. Sox2 expression in pulmonary non-small cell and neuroendocrine carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010 Jan;18(1):55-61.
213. Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal.* 2013 May;25(5):1264-71.
214. Campbell PA, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Rudnicki MA. Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *PLoS One.* 2007;2(6):e553.
215. Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, Draper JS, Bahrami AR, Morton I, et al. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells.* 2004;22(5):659-68.
216. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998 Oct 30;95(3):379-91.
217. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):372-6.
218. Zeineddine D, Papadimou E, Chebli K, Gineste M, Liu J, Grey C, et al. Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell.* 2006 Oct;11(4):535-46.

219. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 1992 Sep 11;20(17):4613-20.
220. Cauffman G, Liebaers I, Van Steirteghem A, Van de Velde H. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2685-91.
221. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005 Feb;26(2):495-502.
222. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Trosko JE, Chang CC, Kiupel M. Expression of the embryonic transcription factor Oct4 in canine neoplasms: a potential marker for stem cell subpopulations in neoplasia. *Vet Pathol.* 2007 Nov;44(6):893-900.
223. Zangrossi S, Marabese M, Broggin M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E, et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells.* 2007 Jul;25(7):1675-80.
224. Vetro C, Romano A, Ancora F, Coppolino F, Brundo MV, Raccuia SA, et al. Clinical Impact of the Immunome in Lymphoid Malignancies: The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Front Oncol.* 2015;5:104.
225. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood.* 1997 Jul 15;90(2):489-519.
226. Mitelman F. Catalogue of chromosome aberrations in cancer. *Cytogenet Cell Genet.* 1983;36(1-2):1-515.
227. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997 Nov 7;278(5340):1059-64.
228. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, Hamalainen E, Alhonen L, Janne J. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1992 Oct 15;80(8):2074-80.
229. Dante R, Dante-Paire J, Rigal D, Roizes G. Methylation patterns of long interspersed repeated DNA and alphoid repetitive DNA from human cell lines and tumors. *Anticancer Res.* 1992 Mar-Apr;12(2):559-63.
230. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, Ronchetti D, Mosca L, Deliliers GL, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis.* 2009 Aug;30(8):1330-5.
231. Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Kim CS, Nowell PC, Lange BJ, et al. Panhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment-related leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11583-8.
232. Super HG, Strissel PL, Sobulo OM, Burian D, Reshmi SC, Roe B, et al. Identification of complex genomic breakpoint junctions in the t(9;11) MLL-AF9 fusion gene in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 Oct;20(2):185-95.
233. Pazin DE, Albrecht KH. Developmental expression of Smoc1 and Smoc2 suggests potential roles in fetal gonad and reproductive tract differentiation. *Dev Dyn.* 2009 Nov;238(11):2877-90.
234. Gersdorff N, Muller M, Schall A, Miosge N. Secreted modular calcium-binding protein-1 localization during mouse embryogenesis. *Histochem Cell Biol.* 2006 Dec;126(6):705-12.
235. Ciarcia R, d'Angelo D, Pacilio C, Pagnini D, Galdiero M, Fiorito F, et al. Dysregulated calcium homeostasis and oxidative stress in chronic myeloid leukemia (CML) cells. *J Cell Physiol.* 2010 Aug;224(2):443-53.

236. Vannahme C, Smyth N, Miosge N, Gosling S, Frie C, Paulsson M, et al. Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):37977-86.
237. Batsi C, Markopoulou S, Kontargiris E, Charalambous C, Thomas C, Christoforidis S, et al. Bcl-2 blocks 2-methoxyestradiol induced leukemia cell apoptosis by a p27(Kip1)-dependent G1/S cell cycle arrest in conjunction with NF-kappaB activation. *Biochem Pharmacol*. 2009 Jul 1;78(1):33-44.
238. Ostertag EM, Prak ET, DeBerardinis RJ, Moran JV, Kazazian HH, Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res*. 2000 Mar 15;28(6):1418-23.
239. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008 Feb;4(2):151-75.
240. Wu J, Hu CP, Gu QH, Li YP, Song M. Trichostatin A sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to apoptosis by up-regulating death-associated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin*. 2010 Jan;31(1):93-101.
241. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jan;60(1):6-20.
242. Defoort EN, Kim PM, Winn LM. Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol*. 2006 Apr;69(4):1304-10.
243. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36734-41.
244. Savage AL, Wilm TP, Khursheed K, Shatunov A, Morrison KE, Shaw PJ, et al. An evaluation of a SVA retrotransposon in the FUS promoter as a transcriptional regulator and its association to ALS. *PLoS One*. 2014;9(6):e90833.
245. Downing JR, Head DR, Raimondi SC, Carroll AJ, Curcio-Brint AM, Motroni TA, et al. The der(11)-encoded MLL/AF-4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11)(q21;q23)-containing acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):330-5.
246. Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, Inazawa J, et al. Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):80-9.
247. Zempleni J, Chew YC, Bao B, Pestinger V, Wijeratne SS. Repression of transposable elements by histone biotinylation. *J Nutr*. 2009 Dec;139(12):2389-92.
248. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
249. Lobachev KS, Stenger JE, Kozyreva OG, Jurka J, Gordenin DA, Resnick MA. Inverted Alu repeats unstable in yeast are excluded from the human genome. *EMBO J*. 2000 Jul 17;19(14):3822-30.
250. Voineagu I, Narayanan V, Lobachev KS, Mirkin SM. Replication stalling at unstable inverted repeats: interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):9936-41.
251. Zhu ZB, Hsieh SL, Bentley DR, Campbell RD, Volanakis JE. A variable number of tandem repeats locus within the human complement C2 gene is associated with a retroposon derived from a human endogenous retrovirus. *J Exp Med*. 1992 Jun 1;175(6):1783-7.

252. Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol.* 2009 Aug;19(8):414-22.
253. Jacobs FM, Greenberg D, Nguyen N, Haeussler M, Ewing AD, Katzman S, et al. An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes ZNF91/93 and SVA/L1 retrotransposons. *Nature.* 2014 Dec 11;516(7530):242-5.
254. Kulski JK, Shigenari A, Inoko H. Polymorphic SVA retrotransposons at four loci and their association with classical HLA class I alleles in Japanese, Caucasians and African Americans. *Immunogenetics.* 2010 Apr;62(4):211-30.
255. Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, et al. The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One.* 2006;1:e54.
256. Noutsopoulos D, Markopoulos G, Vartholomatos G, Kolettas E, Kolaitis N, Tzavaras T. VL30 retrotransposition signals activation of a caspase-independent and p53-dependent death pathway associated with mitochondrial and lysosomal damage. *Cell Res.* 2010 May;20(5):553-62.
257. Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2006;6:13.
258. Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature.* 2005 Jun 16;435(7044):903-10.
259. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol.* 2006 Apr 14;357(5):1383-93.
260. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):907-13.
261. Hedges DJ, Deininger PL. Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat Res.* 2007 Mar 1;616(1-2):46-59.
262. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003 Mar;3(3):155-68.
263. Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst).* 2004 Aug-Sep;3(8-9):889-900.
264. Buchan JR, Kolaitis RM, Taylor JP, Parker R. Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell.* 2013 Jun 20;153(7):1461-74.
265. Guo H, Chitiprolu M, Gagnon D, Meng L, Perez-Iratxeta C, Lagace D, et al. Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nat Commun.* 2014;5:5276.
266. Elbarbary RA, Lucas BA, Maquat LE. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science.* 2016 Feb 12;351(6274):aac7247.
267. Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy.* 2014 Mar;10(3):431-41.
268. Zhou S, Zhao L, Kuang M, Zhang B, Liang Z, Yi T, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett.* 2012 Oct 28;323(2):115-27.

269. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 2005 Jul;1(2):84-91.
270. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007 Nov-Dec;3(6):542-5.
271. Pursiheimo JP, Rantanen K, Heikkinen PT, Johansen T, Jaakkola PM. Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene*. 2009 Jan 22;28(3):334-44.
272. Wang S, Xu ZY, Wang LF, Su W. CD133+ cancer stem cells in lung cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:447-53.
273. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*. 2008;3(7):e2637.
274. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):10946-51.
275. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16281-6.
276. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008 Mar;15(3):504-14.
277. Huna A, Salmina K, Erenpreisa J, Vazquez-Martin A, Krigerts J, Inashkina I, et al. Role of stress-activated OCT4A in the cell fate decisions of embryonal carcinoma cells treated with etoposide. *Cell Cycle*. 2015;14(18):2969-84.
278. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrisey EE, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*. 2007 Jul;134(13):2521-31.
279. Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev Biol*. 2008 May 1;317(1):296-309.
280. Saito S, Onuma Y, Ito Y, Tateno H, Toyoda M, Hidenori A, et al. Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. *BMC Syst Biol*. 2011;5 Suppl 1:S17.
281. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*. 2012 Nov 22;31(47):4898-911.
282. Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, et al. Expression of Sox2 and Oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(6):7663-75.
283. Barbouti A, Doulias PT, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 1;33(5):691-702.
284. Konisti S, Mantziou S, Markopoulos G, Thrasyvoulou S, Vartholomatos G, Sainis I, et al. H₂O₂ signals via iron induction of VL30 retrotransposition correlated with cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 15;52(10):2072-81.
285. Noutsopoulos D, Markopoulos G, Koliou M, Dova L, Vartholomatos G, Kolettas E, et al. Vanadium induces VL30 retrotransposition at an unusually high level: a possible carcinogenesis mechanism. *J Mol Biol*. 2007 Nov 16;374(1):80-90.

286. Woodbine L, Brunton H, Goodarzi AA, Shibata A, Jeggo PA. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Res.* 2011 Sep 1;39(16):6986-97.
287. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):103-15.
288. Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol.* 2008 Jan;21(1):28-44.
289. Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene.* 1999 Nov 1;18(45):6104-11.
290. Buttke TM, Sandstrom PA. Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Radic Res.* 1995 May;22(5):389-97.
291. Nordstrom DK. Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science.* 2002 Jun 21;296(5576):2143-5.
292. Flora SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med.* 2011 Jul 15;51(2):257-81.
293. Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. ATM activation by oxidative stress. *Science.* 2010 Oct 22;330(6003):517-21.
294. Reichenbach J, Schubert R, Schindler D, Muller K, Bohles H, Zielen S. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Jun;4(3):465-9.
295. Eaton JS, Lin ZP, Sartorelli AC, Bonawitz ND, Shadel GS. Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. *J Clin Invest.* 2007 Sep;117(9):2723-34.
296. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 2;107(9):4153-8.
297. Cosentino C, Grieco D, Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J.* 2011 Feb 2;30(3):546-55.
298. Hagan CR, Sheffield RF, Rudin CM. Human Alu element retrotransposition induced by genotoxic stress. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):219-20.
299. Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 1;1400(1-3):139-54.
300. Holm C, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res.* 1989 Nov 15;49(22):6365-8.
301. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer.* 2008 Jul 1;123(1):8-13.
302. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002 Jan;196(1):1-7.
303. Bird AP, Taggart MH. Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Res.* 1980 Apr 11;8(7):1485-97.
304. Whitelaw E, Martin DI. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):361-5.
305. Menendez L, Benigno BB, McDonald JF. L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas. *Mol Cancer.* 2004 Apr 26;3:12.

306. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:75-100.
307. Montoya-Durango DE, Liu Y, Teneng I, Kalbfleisch T, Lacy ME, Steffen MC, et al. Epigenetic control of mammalian LINE-1 retrotransposon by retinoblastoma proteins. *Mutat Res.* 2009 Jun 1;665(1-2):20-8.
308. Garcia-Perez JL, Morell M, Scheys JO, Kulpa DA, Morell S, Carter CC, et al. Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature.* 2010 Aug 5;466(7307):769-73.