



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ-
ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

**ΘΡΑΣΥΒΟΥΛΟΥ ΣΩΤΗΡΟΥΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Η παρούσα διατριβή είναι αφιερωμένη
στην μνήμη του πατέρα μου

Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» της κ. Θρασυβούλου Σωτηρούλας: 30-3-2009

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 30-3-2009 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία».

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Μπριασούλης Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Ορισμός Θέματος: 30-3-2009

«Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης με την επιθηλιακή –μεσεγχοματική διαδικασία »»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: 10-11-2015

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Καθηγητής Ογκολογίας 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
Κωνσταντίνου Ανδρέας	Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κύπρου
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 9-12-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιοτεχνολογία» και έχει χρηματοδοτηθεί από την Κυπριακή Δημοκρατία και το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης της ΕΕ με πρόγραμμα ΠΕΝΕΚ (Δέσμη 2009-2010, Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας Κύπρου). Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Θεόδωρου Τζαβάρα σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιολογίας Καρκίνου και Χημειοπροφύλαξης, του Πανεπιστημίου Κύπρου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ανδρέα Κωνσταντίνου.

Θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Θεόδωρο Τζαβάρα για τα όσα έχω μάθει κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, τη σωστή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές οι οποίες ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της Διδακτορικής Διατριβής μου και τον καθηγητή μου κ. Ανδρέα Κωνσταντίνου για την εκτίμηση, τη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που έδειξε στη συνεργασία μας στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΚ.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας και συνεργασίας που μου προσέφεραν, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Εργαστηρίου Βιολογίας Καρκίνου και Χημειοπροφύλαξης, του Πανεπιστημίου Κύπρου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Γκάρτσιου Φωτεινή, Μαρκόπουλο Γιώργο, Νουτσόπουλο Δημήτρη, Βλαντό Βασίλη, Μάντζιου Στεφανία, τα παιδιά από τα «γειτονικά» εργαστήρια Εύη Βραζέλη, Μαλταμπέ Βιολέτα, Ντουχανιάρη Αλεξάνδρα καθώς και τα παιδιά από το Εργαστήριο Βιολογίας Καρκίνου και Χημειοπροφύλαξης, του Πανεπιστημίου Κύπρου Παπαγεώργη Πάνο, Πίττα Χαρά, Νεοφύτου Χριστιάνα για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο από το Εργαστήριο Αιματολογίας του Π.Π.Ν.Ι. για τη σημαντική συμβολή του στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και την κ. Χαρχαντή Αντωνία από το Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας για την αξιοσημείωτη βοήθειά της στο κομμάτι της ιστολογικής ανάλυσης νεοπλασμάτων. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κ. Κούκλη Παναγιώτη

και κ. Μπριασούλη Ευάγγελο καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εφταμελούς επιτροπής μου κ. Κωλέττα Ευάγγελο, κ. Γεωργίου Ιωάννη και κ. Φριλίγγο Ευστάθιο για τη συνεργασία και βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου που στήριξαν την απόφασή μου και μου άνοιξαν το δρόμο για να συνεχίσω τις σπουδές μου καθώς και τα αδέρφια μου και τους στενούς φίλους μου για την συνεχή υποστήριξη και κατανόηση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Μεταθετά στοιχεία.....	1
1.2 Διάκριση μεταθετών στοιχείων.....	1
1.3 DNA τρανσποζόνια.....	2
1.4 Ρετρομεταθετά στοιχεία.....	3
1.4.1 Ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR (non-LTR retrotransposons).....	4
1.4.1.1 Τα μεταθετά στοιχεία SINES.....	4
1.4.1.2 Τα μεταθετά στοιχεία LINEs- Μηχανισμός μετάθεσης.....	4
1.4.1.3 Τα μεταθετά στοιχεία LINE – καρκινογένεση.....	12
1.5 LTR Ρετροτρανσποζόνια [Ενδογενείς ρετροϊοί (ERVs)] – Μηχανισμός ρετρομετάθεσης.....	16
1.6 Τα ρετροτρανσποζόνια VL30, ένας ασυνήθιστος τύπος LTR-ρετροτρανσποζονίων και η εμπλοκή τους στην καρκινογένεση.....	20
1.7 Ο ρόλος των Μεταθετών Στοιχείων.....	24
1.8 Κυτταρικοί μηχανισμοί προστασίας από τα γεγονότα ρετρομετάθεσης.....	31
1.9 Η Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάπτωση (EMT) & Καρκίνος.....	36
1.9.1. E-καντερίνη και EMT.....	40
1.9.2. Μεταγραφικοί παράγοντες Snail, Slug, Twist και TGF-β & EMT.....	43
1.9.3. Επαγόμενοι δείκτες μεσεγχύματος κατά την EMT.....	46
1.10 Μαστικός αδένας και βλαστικά κύτταρα.....	47
1.11 Καρκινικά βλαστικά κύτταρα ή κύτταρα έναρξης όγκου και ογκογένεση.....	51
1.12. EMT και επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων.....	58
1.13 ΣΚΟΠΟΣ.....	61
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
2.1 Περιγραφή ενός ανασυνδιασμένου στοιχείου VL30/EGFP για τη μελέτη της ρετρομετάθεσης.....	63
2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	64
2.2.2 Κυτταρικές σειρές.....	65
2.2.2.1 HC11.....	65
2.2.2.2 EPH4 (J3B1).....	65
2.2.2.3 C127.....	65
2.2.2.4 NIH3T3.....	65
2.2.2.5 SVTT1.....	66

2.2.3 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας.....	66
2.2.3.1 Θρεπτικά υλικά.....	66
2.2.3.2 Διάλυμα έκπλυσης.....	66
2.2.3.3 Διάλυμα θρυψίνης/EDTA.....	66
2.2.4 Αραιώση και επανακαλλιέργεια κυττάρων.....	67
2.2.5 Αποθήκευση κυττάρων (stock).....	67
2.2.6 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων σε καλλιέργεια μέσω λιπιδίων (transfection).....	68
2.2.7 Μικροσκοπία φθορισμού (<i>Fluorescence microscopy</i>).....	69
2.2.8 Εξέταση κυττάρων για ικανότητα σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης (<i>anchorage-independent growth test</i>).....	70
2.2.9 Εξέταση ικανότητας επιβίωσης και σχηματισμού μαμμόσφαιρων υπό συνθήκες ελαττωμένης προσκόλλησης.....	71
2.2.10 Εξέταση ικανότητας αυτοανανέωσης (<i>self-renewal test</i>) μαμμόσφαιρων.....	71
2.2.11 Διάκριση κυτταρικών τύπων μαμμόσφαιρας με Αιματοξυλίνη.....	72
2.2.12 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence.....	73
2.2.14 Ανάπτυξη θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων σε matrigel.....	74
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΛΩΝΩΝ.....	75
2.3.1 Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA για ανάλυση PCR.....	75
2.3.2 Ανάλυση PCR.....	75
2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	78
2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA.....	78
2.4.1 Real-Time PCR.....	78
2.5 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	79
2.5.2 Ανάλυση πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (<i>Western blotting</i>).....	79
2.5.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (<i>Indirect Immunofluorescence</i>).....	83
2.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟΥ DNA.....	85
2.6.1 Κατασκευή του πλασμιδίου pCDNA3.1/MMTV-RT.....	85
2.6.2 Κατασκευή πλασμιδίου pLKO-Puro/PSF (shRNA).....	87
2.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (<i>FACS</i>).....	89
2.7.1 Μέτρηση ποσοστού ρετρομετάθεσης μέσω κυτταρομετρίας ροής (<i>FACS</i>).....	89
2.7.2 Ανίχνευση επιφανειακών δεικτών μέσω άμεσου ανοσοφθορισμού των και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής.....	90
2.8 In vivo ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	91

2.8.1	In vivo εξέταση δυνατότητας καρκινογένεσης θετικών ρετρομετάθεσης HC11-VL30 και HC11-L1 σε ποντίκια Balb/C.....	91
2.8.2	Απομόνωση κυττάρων από ιστούς-νεοπλάσματα.....	92
2.8.3	Σκλήνωση ιστών και τομές παραφίνης.....	92
2.8.5	Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης σε τομές παραφίνης/ κρυστάτη.....	93
2.8.5	Ανοσοιστοχημεία σε τομές παραφίνης.....	94
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
3.1	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ.....	95
3.1.1	Τα επιθηλιακά κύτταρα μαστού παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης.....	95
3.1.2	Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε κύτταρα κλώνων.....	100
3.1.3	Η ρετρομετάθεση VL30 και LINE-1 (L1) οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό των προγονικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού HC11.....	103
3.2	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΕΜΤ.....	108
3.2.1	Τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 αποκτούν τα βασικά χαρακτηριστικά της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάπτωσης.....	108
3.2.2	Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCA DP-XCelligence....	114
3.2.3	Ανάπτυξη θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 και HC11-L1 σε matrigel.....	117
3.3	ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ VL30 ΚΑΙ LINE-1, ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΑΜΜΟΣΦΑΙΡΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	119
3.3.1	Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-LINE παρουσιάζουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων.....	120
3.3.2	Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης VL30 και LINE-1 με το σχηματισμό μαμμοσφαιρών υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11.....	122
3.3.3	Οι θετικές σε ρετρομετάθεση μαμμόσφαιρες HC11-VL30 και HC11-L1 έχουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων.....	124
3.3.4	Κύτταρα απομονωμένων μαμμόσφαιρων HC11-VL30 και HC11-LI εμφανίζουν μεταβολή έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD24/CD44.....	127
3.3.5	Οι θετικές σε ρετρομετάθεση VL30 και LINE-1 μαμμόσφαιρες διαφοροποιούνται σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους.....	129
3.4	Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης VL30 και LINE-1 σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11 με την επαγωγή καρκινογένεσης.....	135

3.4.1 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα έχουν την ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά μέσα.....	136
3.4.2 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-LINE είναι ικανά να παράγουν όγκους σε συγγενικά ποντίκια Balb/c.....	138
3.4.3 Απομονωμένα κύτταρα από όγκους HC11-LINE ποντικών Balb/c, παράγουν μαμμόσφαιρες θετικές ρετρομετάθεσης.....	143
3.5 Προσέγγιση του μηχανισμού δράσης των ρετροτρανσποζονίων.....	145
3.5.1 Η επίδραση του MMTV στην επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης VL30 & μείωσης του χρόνου επαγωγής EMT.....	145
3.5.2 Η εμπλοκή της ογκοπρωτεΐνης PSF στο μηχανισμό της VL30-επαγόμενης EMT και παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων.....	147
3.5.3 Ανεύρεση ενσωματώσεων του ρετροτρανσποζονίου VL30 με τη τεχνική inverse PCR σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους.....	148
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	151
5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	161
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	168

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν βασικά συστατικά όλων των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων και είναι ευδιάκριτες αλληλουχίες επαναλαμβανόμενου DNA, τα οποία κατέχουν την αξιοσημείωτη δυνατότητα να μετατίθενται ή να αυτοδιπλασιάζονται σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα ενός κυττάρου (1-3). Τα γονιδιώματα των θηλαστικών είναι πλούσια σε μεταθετά στοιχεία (4). Συγκεκριμένα αποτελούν το 45,36% του ανθρώπινου γονιδιώματος (5) και το 38.55% του γονιδιώματος του ποντικού (6).

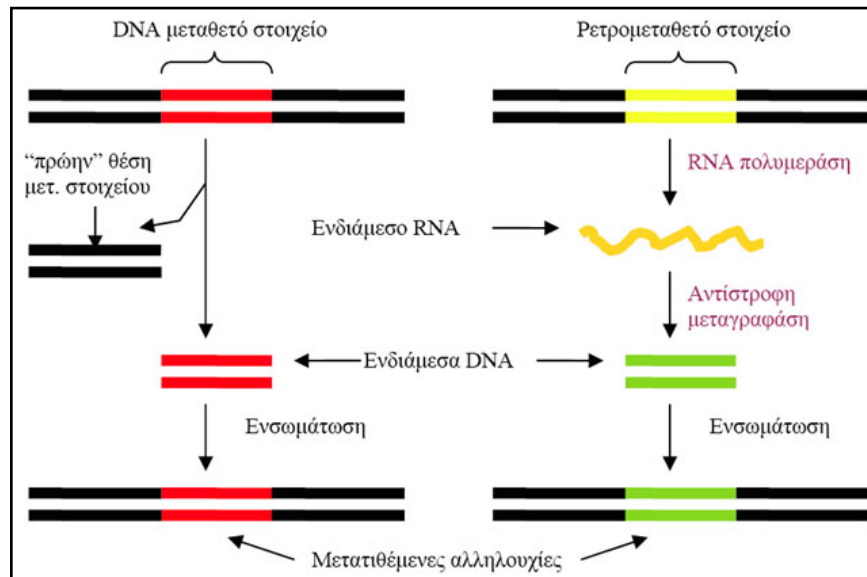
Η ανακάλυψη ότι το γένωμα περιέχει τμήματα DNA ικανά να μετατίθενται σε νέες θέσεις οδήγησε στην αμφισβήτηση της επικρατούσας άποψης ότι τα γονίδια κληρονομούνται σε σταθερή μορφή από τη μια γενεά στην επόμενη (7). Τα μεταθετά στοιχεία ανακαλύφθηκαν, αρχικά, τη δεκαετία του 1940, από την αμερικανίδα γενετίστρια Barbara McClintock (1902-1992), η οποία είχε ως αντικείμενο έρευνάς της τη μοριακή βάση της χρωματικής απόκλισης των σπόρων αραβοσίτου (8). Η Barbara McClintock ερμήνευσε τις παρατηρήσεις της στο επίπεδο της γονιδιακής ρύθμισης, από κάποιου είδους ρυθμιστικά στοιχεία, ικανά να μετακινούνται από θέση σε θέση γύρω από τα χρωμοσώματα. Η σπουδαιότητα της πρωτοπόρας αυτής ανακάλυψης εκτιμήθηκε πλήρως πολλά χρόνια αργότερα και βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1983. Χρειάστηκε επιπλέον, μισός αιώνας για την κατανόηση του τρόπου δράσης των μεταθετών στοιχείων και των επιπτώσεων που θα μπορούσαν να επιφέρουν, όπως είναι ο σημαντικός ρόλος τους στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων ρυθμίζοντας τη λειτουργία γονιδίων (9).

1.2 Διάκριση μεταθετών στοιχείων

Τα μεταθετά στοιχεία χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες βάσει του μηχανισμού μετάθεσής των (Εικόνα 1.1): **α.** Τα DNA τρανσποζόνια, τα οποία μετακινούνται κυρίως με ένα μηχανισμό «αποκοπής και ενσωμάτωσης» («cut and paste mechanism») και **β.** Τα ρετροτρανσποζόνια, που μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» («copy and paste mechanism»), που περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφή ενός ρετροτρανσποζονιακού-ενδιάμεσου RNA και την περαιτέρω

εισαγωγή του συμπληρωματικού αντιγράφου cDNA σε μια νέα θέση στο γονιδίωμα. Έτσι τα DNA τρανσποζόνια κινητοποιούνται μέσω ενός ενδιάμεσου DNA ενώ τα ρετρομεταθετά στοιχεία, απαιτούν για την μετάθεσή τους την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (3).

Τόσο τα DNA τρανσποζόνια, όσο και τα ρετροτρανσποζόνια χωρίζονται περαιτέρω σε αυτόνομα και μη αυτόνομα μεταθετά στοιχεία, αναλόγως της ικανότητάς τους να κωδικοποιούν τις απαραίτητες για την μετάθεσή των λειτουργίες. Τα μη αυτόνομα τρανσποζόνια στερούνται των τυπικών αλληλουχιών των αυτόνομων μεταθετών στοιχείων και πιστεύεται ότι υποκλέπτουν, για την πραγματοποίηση της μετάθεσή τους, τη μηχανή μετάθεσης των αυτόνομων στοιχείων (1, 10, 11).



Εικόνα 1.1: Μηχανισμοί μετάθεσης μεταθετών στοιχείων

1.3 DNA τρανσποζόνια

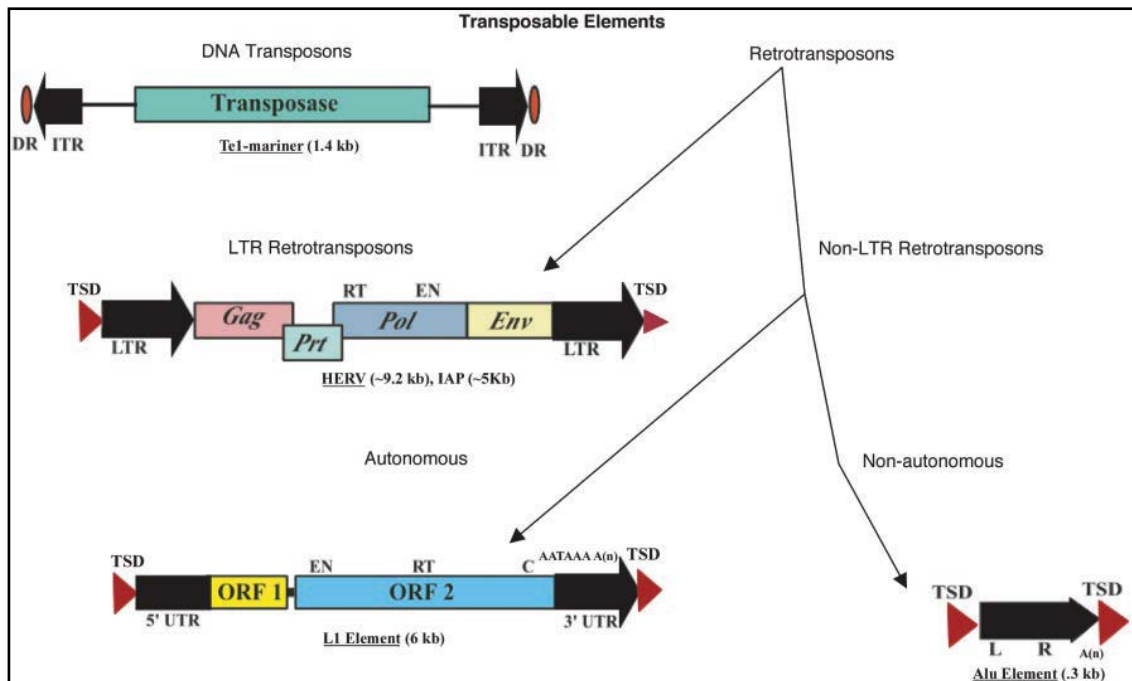
Η πρώτη κατηγορία μεταθετών στοιχείων, τα DNA τρανσποζόνια είναι κοινά σε πολλούς οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο (1). Αποτελούν περίπου το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος (5), απαντώντας σε 294.000 αντίγραφα και το 0.88% του γονιδιώματος του ποντικού (6), απαντώντας σε 112.000 αντίγραφα με μοριακό μέγεθος από 1 ως 3 Kb. Τα περισσότερα DNA τρανσποζόνια, αποτελούν αυτόνομα μεταθετά στοιχεία και δομικά συνίστανται από τρεις περιοχές: την κεντρική περιοχή που κωδικοποιεί για μια τρανσποζάση, δύο αντίστροφες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 5 έως

500 bp και δύο ευθείες επαναλήψεις που βρίσκονται στα άκρα τους μεγέθους 2 έως και 8 bp (Εικόνα 1.2).

1.4 Ρετρομεταθετά στοιχεία:

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν ενδογενή συστατικά των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων και είναι ικανά να μετατίθενται σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα, μέσω ενός ενδιάμεσου γενωμικού RNA. Καταλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό του γονιδιώματος των θηλαστικών. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο αποτελούν περίπου το 43.2% (5) του γονιδιώματός του και στον ποντικό το 37.3% (6). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία, όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» για τη μετάθεσή των. Αφού το αρχικό αντίγραφο δεν αποκόπτεται και παραμένει στην θέση του, αυτή η διαδικασία που καλείται ρετρομετάθεση, αντιστοιχεί σε ένα μηχανισμό διπλασιασμού του ρετροτρανσποζονίου στο γένωμα (3). Η ρετρομετάθεση ευθύνεται κατά μεγάλο μέρος για τον υψηλό αριθμό αντιγράφων ρετροτρανσποζονίων στο γονιδίωμα πολλών σπονδυλωτών (3).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία χωρίζονται επιπλέον σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη ή απουσία μακρών τελικών επαναλήψεων (LTR).



Εικόνα 1.2: Κατηγορίες μεταθετών στοιχείων

1.4.1 Ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR (non-LTR retrotransposons)

1.4.1.1 Τα μεταθετά στοιχεία SINEs

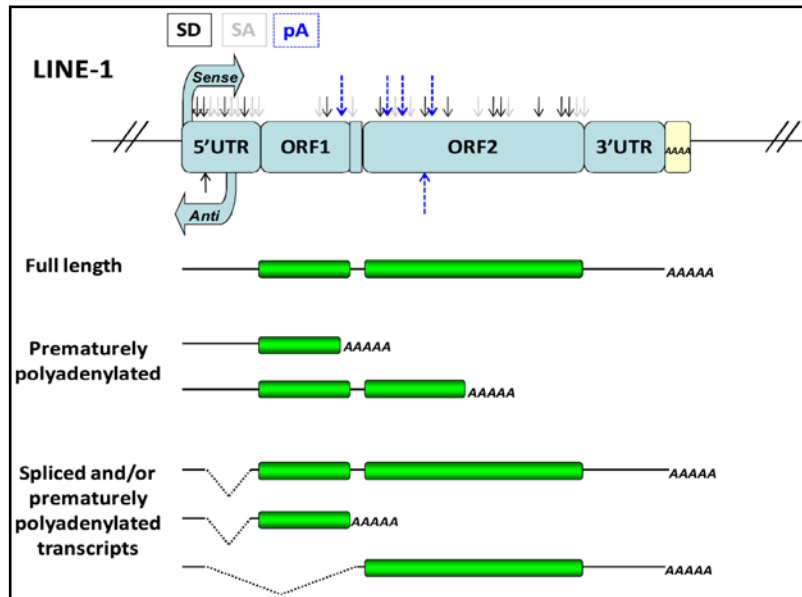
Τα μεταθετά στοιχεία SINEs, αποτελούν βραχείες διάσπαρτες αλληλουχίες, μεγέθους 100-300bp (5) και ανήκουν στην κατηγορία των μη αυτόνομων, χωρίς LTR ρετροτρανσποζονίων (3). Αποτελούν το 13.64% του ανθρώπινου γονιδιώματος και το 8.22% του γονιδιώματος του ποντικού (5, 6). Στον άνθρωπο ως κύρια ενεργή οικογένεια SINE έχουν προσδιοριστεί τα στοιχεία Alu, αν και πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί μια λιγότερο χαρακτηρισμένη επιπλέον ομάδα στοιχείων SINE, τα SVA. Τα SVA αν και συναντώνται σε σχετικά μικρό αριθμό αντιγράφων (3000 αντίγραφα) στο ανθρώπινο γονιδίωμα, είναι πιθανώς αρκετά ενεργά, υψηλού βαθμού πολυμορφικά και ευθύνονται για γνωστές ανθρώπινες ασθένειες (7, 12). Αντίθετα στον ποντικό διακρίνονται τέσσερις διακριτές οικογένειες (B1, B2, ID, B4) (6), εκ των οποίων ως κύριες θεωρούνται τα στοιχεία 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 (13).

Τα SINEs φέρουν ένα εσωτερικό υποκινητή πολυμεράσης III και δεν κωδικοποιούν δικές τους πρωτεΐνες (14) (Εικόνα 1.2). Δεδομένα υποστηρίζουν ότι αυτά τα μη αυτόνομα μεταθετά στοιχεία χρησιμοποιούν για την μετάθεσή τους την ενζυματική μηχανή των LINE. Πράγματι, τα περισσότερα SINEs έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τα LINEs, συμπεριλαμβανομένων της πολυαδενυλιωμένης ουράς στο 3' άκρο και ευθείες επαναλήψεις στα άκρα του στοιχείου (15). Αρχικά τα SINEs μεταγράφονται σε RNA από την RNA πολυμεράση III και ακολούθως χρησιμοποιούν τη ενζυμική δράση των ενεργών στοιχείων LINEs, για την αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση τους στο γένωμα (15).

1.4.1.2 Τα μεταθετά στοιχεία LINEs- Μηχανισμός μετάθεσης

Οι μακρές διάσπαρτες αλληλουχίες (long interspersed elements, LINEs) αποτελούν αυτόνομα μεταθετά στοιχεία, καθώς κωδικοποιούν τις απαραίτητες λειτουργίες για την ρετρομετάθεσή των, αν και πιθανώς να χρειάζονται κάποιες πρωτεΐνες του ξενιστή προκειμένου να ολοκληρωθεί ένα επιτυχές γεγονός

ρετρομετάθεσης (16). Διακρίνονται σε τρεις φυλογενετικά απομακρυσμένα σχετιζόμενες οικογένειες, τις LINE-1, LINE-2 και LINE-3, όπου μόνο η ομάδα των LINE-1 είναι ενεργή (5). Αποτελούν το 21% του ανθρώπινου γονιδιώματος, απαντώντας σε 850.000 αντίγραφα (5), ενώ στο γονιδίωμα του ποντικού εμπεριέχονται 660.000 αντίγραφα καταλαμβάνοντας το 19.2% του γονιδιώματός του (6).

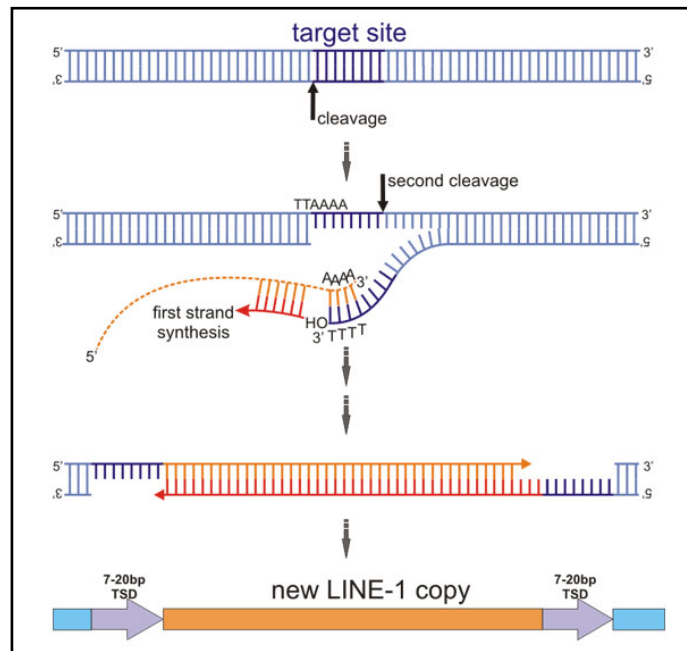


Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση τυπικής δομής ενός στοιχείου *LINE-1*. Απεικονίζονται οι δύο υποκίνητες στο 5'UTR, οι κύριες θέσεις πολυαδενυλίωσης (pA), δότη ματίσματος (SD) και δέκτη ματίσματος (SA) στην αλληλουχία των L1 και των mRNAs των L1 που προκύπτουν. Τα μαύρα βέλη αντιπροσωπεύουν τις θέσεις SD, τα γκρι βέλη τις θέσεις SA και τα μπλε βέλη τις pA θέσεις.

Ένα πλήρους μεγέθους ανθρώπινο L1, φέρει μια 5'-αμετάφραστη περιοχή (UTR), μήκους 900 νουκλεοτιδίων, δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ORF1 και ORF2 και μια μικρότερου μεγέθους 3' UTR περιοχή, που καταλήγει σε μια poly(A) ουρά περιέχοντας ένα λειτουργικό σήμα πολυαδενυλίωσης (*polyA, signal tail*) (7) (Εικόνα 1.2 & 1.3). Τα ανθρώπινα ρετροτρανσποζόνια L1 φέρουν δύο ρυθμιστικές μεταγραφικές περιοχές που εντοπίζονται στην 5'-αμετάφραστη περιοχή, 5'UTR (Εικόνα 1.3) : (α) ένα πρόσθιο (sense) εσωτερικό υποκινητή πολυμεράσης II, που οδηγεί την μεταγραφή του πλήρους μεγέθους L1, και (β) ένα ανάστροφο υποκινητή (antisense promoter, ASP), ο οποίος οδηγεί την μεταγραφή προς την αντίστροφη κατεύθυνση παρακείμενων περιοχών του L1, παράγοντας χειμερικά μετάγραφα (17, 18).

Οι νέες θέσεις ένθεσης των αντιγράφων L1, πλαισιώνονται από βραχείες ευθείες επαναλήψεις (*Target Site Duplications, TSDs*), ποικίλου μεγέθους (2 ως 20 bp), που δημιουργούνται από τον διπλασιασμό της θέσης στόχου DNA μετά τη ρετρομετάθεση. Σε αντίθεση με τα ανθρώπινα L1s, στα ποντικίσια L1s η περιοχή 5'UTR αποτελείται από συνεχόμενες επαναλήψεις <200bp που καλούνται μονομερή (monomers) και εντοπίζονται ανοδικά της ενός αντιγράφου μη-μονομερούς περιοχής (single-copy, nonmonomeric sequence) του 5'UTR (19). Η σύνδεση των μονομερών σε γονίδια-ανταποκριτές (reporter genes), έχει αποδείξει ότι κατέχουν ενεργότητες υποκινητή καθώς επίσης ότι η αύξηση των μονομερών αυξάνει τα επίπεδα της μεταγραφής (20).

Η μεταγραφή ενός L1, από τον εσωτερικό υποκινητή του, παράγει το πλήρους μεγέθους δικιστρωνικό L1 mRNA (6Kb και 7.5Kb για τα L1s ανθρώπου και ποντικού αντίστοιχα), καθώς και ποικίλου μεγέθους επεξεργασμένα L1 RNA παράγωγα, η πλειοψηφία των οποίων δεν είναι ικανά να ρετρομετατίθενται (21, 22) (Εικόνα 1.3). Μέσω ενός ασυνήθιστου μηχανισμού πραγματοποιείται μεταγραφή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης ORF2, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 150kDa (*ORF2p*), με ενεργότητες ενδονουκλεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης (7, 23) (Εικόνα 1.4). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 40kDa (*ORF1p*) που σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (*RNP*) και κατέχει ενεργότητα συνοδού νουκλεϊκών οξέων (7, 24, 25). Αφού το L1 mRNA μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα και μεταφραστεί, μετακινείται μαζί με τις δικές του κωδικοποιές πρωτεΐνες στον πυρήνα (5), όπου η πρωτεΐνη ORF2p με ενεργότητα ενδονουκλεάσης πραγματοποιεί μια σχάση στη μια αλυσίδα DNA, στη θέση στόχο (15). Εδώ να σημειωθεί ότι η σχάση από την L1 ενδονουκλεάση πραγματοποιείται σε μια συντηρημένη ακολουθία στο DNA, 3'-AA'TTTT-5', και το προκύπτον πλούσιο σε θυμιδίνη 3' άκρο πριμοδοτεί την αντίστροφη μεταγραφή του πολυαδενυλιωμένου L1 RNA (14) (Εικόνα 1.4). Τα τελευταία στάδια διπλασιασμού της θέσης στόχου, ενσωμάτωσης και σύνδεσης του στοιχείου στο DNA, πιθανώς εξαρτώνται από ένζυμα του κυττάρου ξενιστή (15). Η αντίστροφη μεταγραφάση, συχνά αποτυγχάνει να τελειώσει τη μεταγραφή στο 5' άκρο, οδηγώντας σε πολλές ατελείς, μη λειτουργικές ενθέσεις (5).



Εικόνα 1.4: Ο μηχανισμός μετάθεσης των LINES

Το διπλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περισσότερα από 500,000 αντίγραφα της οικογένειας των στοιχείων LINE-1 (L1). Από αυτά μόνο τα 6000 αντίγραφα L1 είναι άθικτα, εκ των οποίων μόνο τα 100 είναι ρετρομεταθετικά λειτουργικά, με ενεργότητες που κυμαίνονται ποικιλοτρόπως (26, 27). Στην πλειοψηφία τους, τα αντίγραφα L1s στο ανθρώπινο γένωμα έχουν απωλέσει την δυνατότητα μετάθεσής τους λόγω εκφυλισμού του 5' άκρου τους, διαγραφών εσωτερικών αλληλουχιών με επακόλουθο την έλλειψη των απαραίτητων για την μετάθεσή τους πρωτεϊνών ORF1p και ORF2p καθώς και μέσω επιγενετικών μηχανισμών και άλλων μεταλλάξεων (5, 28). Συγκριτικά, το διπλοειδές γονιδίωμα του ποντικού περιέχει περίπου 3000 ενεργά στοιχεία L1 (19). Τα ενεργά στοιχεία έχουν την δυνατότητα να καταστρέψουν ολοσχερώς το γένωμα με μυριάδες τρόπους: συμπεριλαμβανομένων των δίκλωνων θραύσεων στο DNA (DSBs), ικανές να οδηγήσουν σε αποτυχία επιδιόρθωσης των βλαβών (misrepair) ή σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου (cell arrest) ή σε απόπτωση (21, 29, 30), και αυτές που προκύπτουν από την πρόκληση ανακατατάξεων στο γένωμα μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού μεταξύ μη αλληλόμορφων επαναλήψεων

(nonallelic repeats) (13, 29, 31) και επίσης από την ενσωμάτωση των L1s αλλά και την υποβοηθούμενη από τα L1 μετάθεσης μη αυτόνομων στοιχείων (πχ Alu) (11).

Επίσης, η ύπαρξη στην αλληλουχία των ρετροτρανσποζονίων L1 θέσεων ματίσματος, συνήθως, οδηγεί στην παραγωγή επεξεργασμένων-ματισμένων mRNAs των L1, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να ρετρομετατίθενται (32) (Εικόνα 1.3). Το μάτισμα εξυπηρετεί ως ένας από τους πολλαπλούς περιοριστικούς μηχανισμούς παραγωγής πλήρους μεγέθους L1 μεταγράφων, συμβάλλοντας στη σημαντική μείωση των επιβλαβών επιπτώσεων, λόγω ρετρομετάθεσης των στοιχείων L1. Ένα από τα προϊόντα ματίσματος έχει το δυναμικό να παράγει την ORF2 πρωτεΐνη των L1 (33), η οποία έχει σημαντικές επιπτώσεις στην μετάθεση των στοιχείων Alu. Δεδομένα υποστηρίζουν ότι υφίσταται μια σημαντική διακύμανση στην απόδοση των θέσεων ματίσματος στους διάφορους ανθρώπινους ιστούς (33). Το γεγονός αυτό προτείνει την ύπαρξη ενός ιστοειδικού πρότυπου δράσης παραγόντων ματίσματος που ενδεχομένως επηρεάζει την αναγνώριση των θέσεων ματίσματος των L1.

Οι μεταγραφικές ιδιότητες των ρετροτρανσποζονίων L1 τυγχάνουν ιδιαίτερα μεγάλης σημασίας καθότι δεν εμφανίζονται να έχουν ειδικές θέσεις-στόχους των νέων ενθέσεων τους (34-38). Τα ενεργά L1s, αποτελούν σημαντικούς τροποποιητές του γενώματος, διαμορφώνοντας τα γενώματα των θηλαστικών με ποικίλους τρόπους, τόσο εποικοδομητικά όσο και με την πρόκληση βλαβερών συνεπειών για το κύτταρο (16) (Εικόνα 1.5) (7):

Αρχικά, η ρετρομετάθεση είτε ενός πλήρους μεγέθους ρετροτρανσποζονίου L1 (6 kb), είτε ποικίλων μεγεθών L1, ελλειματικών στο 5' άκρο τους, (Εικόνα 1.5 A) σε μια νέα γενωμική θέση (κωδικεύουσα ή μη κωδικεύουσα περιοχή), δύναται να οδηγήσει στην πρόκληση μιας εισαγωγικής μετάλλαξης (17). Συγκεκριμένα, έπειτα από ένα επιτυχές γεγονός ρετρομετάθεσης, ένα ρετρομεταθετό στοιχείο L1 μπορεί να εισέλθει σε ένα γονίδιο (Εικόνα 1.5 C). Η εισαγωγή του σε ένα εξώνιο συνήθως οδηγεί στην διακοπή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης. Εντούτοις ακόμη και η εισαγωγή ενός L1 σε ένα ιντρόνιο μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις, καθώς η νέα αλληλουχία L1 αναπόφευκτα γίνεται μέρος του γονιδίου και του μεταγραφήματός του (34). Λόγω του ότι η RNA πολυμεράση σταδιακά σταματάει και/ή αποδεσμεύεται από το εκμαγείο καθώς συναντά μεγαλύτερη

έκταση λόγω της εισαγωγής αλληλουχιών L1, αναμένεται ότι οι ενθέσεις των L1 οδηγούν σε μείωση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (34).

Επιπρόσθετα η ύπαρξη λειτουργικών υποκινητών, θέσεων πολυαδενυλίωσης και θέσεων ματίσματος στην αλληλουχία των L1 (Εικόνα 1.3) δύνανται να οδηγήσει με πολλούς τρόπους στην διακοπή γονιδίων (39). Πιο ειδικά, τα ρετροτρανσποζόνια L1 φέρουν διάσπαρτα στην αλληλουχία τους πολλαπλά λειτουργικά σήματα πολυαδενυλίωσης (pA) και θέσεις ματίσματος (22, 32, 40). Συγκεκριμένα, η ύπαρξη άφθονων ενεργών θέσεων πολυαδενυλίωσης εντός των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) των L1, πιθανώς να οφείλεται στο ασυνήθιστα υψηλό περιεχόμενο σε AT (22). Οι θέσεις pA χρησιμοποιούνται κατά την μεταγραφή των L1, ώστε να μειώνεται η παραγωγή πλήρους μεγέθους mRNA των ρετροτρανσποζονίων L1 (22), αλλά επίσης μπορούν να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική γονιδιακή έκφραση (34, 41). Ακόμη και οι ενθέσεις βραχύτερων στοιχείων L1, περιέχουν στο 3' άκρο τους (3'UTR) σήματα πολυαδενυλίωσης (pA), ικανά να αναγνωρίζονται κατά την μεταγραφή (42). Η εφαρμογή συγκριτικής γονιδιωματικής (expressed sequence tags, EST) και η ανάλυση ανθρώπινων EST αποκάλυψε ότι τα ρετροτρανσποζόνια L1 συμμετέχουν επίσης και σε γεγονότα ματίσματος με άλλα γονίδια (32), προτείνοντας ότι αυτού του είδους η συμβολή των L1 στο μάτισμα, μπορεί να οδηγήσει στη διακοπή της φυσιολογικής γονιδιακής έκφρασης ή στη δημιουργία εναλλακτικών μεταγράφων mRNA (32).

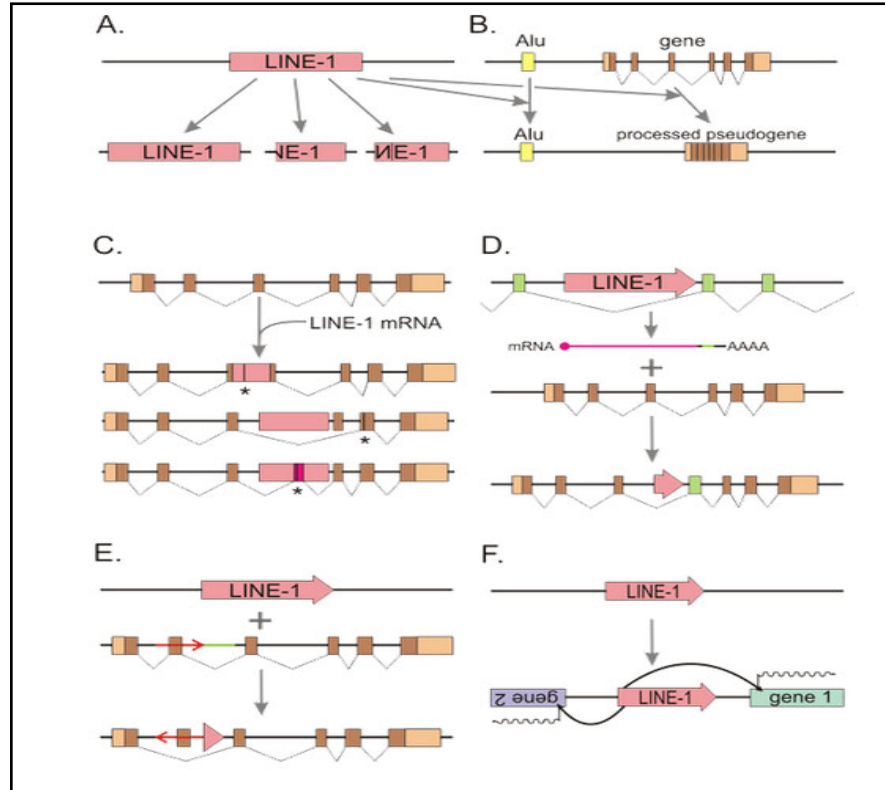
Επιπλέον, τα L1 έχουν σχετικά ένα ασθενές σήμα πολυαδενυλίωσης. Ως εκ τούτου, η RNA πολυμεράση μπορεί να διαβάσει πέραν του σήματος και να μεταγράψει τμήματα παρακείμενου χρωμοσωμικού DNA (3' transduction) (43) (Εικόνα 1.5 D). Στη συνέχεια το υβριδικό αυτό mRNA ρετρομετατίθεται οδηγώντας στην μετάθεση τόσο του L1 (το οποίο είναι συνήθως μερικώς ακρωτηριασμένο στο 5' άκρο ή ακόμη μπορεί να έχει συμβεί και πλήρης απαλοιφή του) και παρακείμενου DNA. Η διαδικασία αυτή μπορεί να αποτελεί τον μηχανισμό μετάθεσης εξονίων (exon shuffling) μεταξύ των γονιδίων.

Επίσης, τα L1s, έχουν συμβάλει στο >35% της μάζας του ανθρώπινου γενώματος (5), όχι μόνο με τη δημιουργία νέων ενσωματώσεών τους αλλά και με την υποβοηθούμενη από αυτά έμμεση αντιγραφή των βραχέων διάσπαρτων αλληλουχιών (SINEs) καθώς και με την εμπλοκή τους στη δημιουργία ψευδογονιδίων. Οι L1

πρωτεΐνες δύνανται να μετακινήσουν *in trans* άλλα RNAs, συμπεριλαμβανομένου αυτών των Alu (11) και SVA, καθώς και άλλων κωδικοποιών mRNAs (protein-coding mRNAs), η αντίστροφη μεταγραφή των οποίων οδηγεί στην γένεση ψευδογονιδίων. Για αυτόν το λόγο θεωρείται ότι τα L1s έχουν παίξει κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη του ανθρώπινου γενώματος. Τα στοιχεία L1 ενοχοποιούνται για την εισαγωγή 8000 ψευδογονιδίων στο ανθρώπινο γένωμα, καθώς και για την ένθεση περισσότερων του ενός εκατομμυρίου στοιχείων SINEs (7, 44, 45) (Εικόνα 1.5 B).

Ακόμη, δύνανται να προκύψουν υβριδικά L1/κυτταρικά μετάγραφα (είτε από τον πρόσθιο είτε τον ανάστροφο υποκινητή), από κάποιες θέσεις ματίσματος (SD & SA) που εντοπίζονται μέσα στην περιοχή 5'UTR σε συνδιασμό με γενωμικές αλληλουχίες (17, 32). Ο συνδιασμός των θέσεων ματίσματος και πολυαδενυλίωσης που εντοπίζονται στην περιοχή 5'UTR των L1, μπορεί να οδηγήσει στην ενσωμάτωση περιοχών που αρχίζουν από το 5'ελλειμματικό άκρο του L1 με κυτταρικά mRNAs. Ένα παράδειγμα αποτελεί η διαλυτή μορφή του γονιδίου *attractin*, η οποία προκύπτει από την ενσωμάτωση τμήματος L1, ως ένα 3'εξώνιο, που περιέχει ένα κωδικόνιο τερματισμού και μια θέση πολυαδενυλίωσης, σε κυτταρικό mRNA (46). Η παράκαμψη του L1 εξωνίου οδηγεί στην παραγωγή mRNA που κωδικοποιεί για την μεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης *attractin*.

Εντούτοις, συχνά, η εισαγωγή ενός ρετροτρανσποζονίου μπορεί να συνοδεύεται από ανακατατάξεις στο DNA (Εικόνα 1.5 E). Επιπρόσθετα των ενεργών L1, τα ανενεργά ελλειμματικά ή με αναδιατάξεις αντίγραφα των L1 μπορεί να εμπλέκονται στο χρωμοσωμικό ομόλογο ανασυνδιασμό. Ο άνισος ομόλογος ανασυνδιασμός μεταξύ επαναλαμβανόμενων γενετικών στοιχείων αποτελεί ένα μηχανισμό που συμβάλλει στη γενετική αστάθεια. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο ομόλογος ανασυνδιασμός μεταξύ δύο γειτονικών αλληλουχιών LINE-1 στο ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα β της κινάσης φωσφορυλίωσης (*PHKB*) και οδηγεί στη διαγραφή 7574 νουκλεοτιδίων από το γενωμικό DNA, συμπεριλαμβανομένου του εξωνίου 8 αυτού του γονιδίου. Αποτέλεσμα είναι η νόσος αποθήκευσης γλυκογόνου (*glycogen storage disease*) μέσω ανεπάρκειας της κινάσης φωσφορυλίωσης (47).



Εικόνα 1.5. Η μετάθεση των LINE-1 τροποποιεί το γένωμα με πολλούς τρόπους **A:** Ρετρομετάθεση *in cis* οδηγεί στην παραγωγή αντιγράφων των L1, τα οποία είτε είναι πλήρους μεγέθους ή πιο συχνά είναι ελλιμενικά στο 5' άκρο τους ή ακρωτηριασμένα και με αναστροφή (5' truncated or 5' truncated with inversion) **B:** Η ORF2 πρωτεΐνη των L1 μπορεί να μεταθέσει τα στοιχεία SINE (πχ Alu) ή άλλα κυτταρικά mRNAs, οδηγώντας στη γένεση ψευδογονιδίων (ρετρομετάθεση *in trans*). Τα εξώνια αντιπροσωπεύονται με σκούρο καφέ χρώμα, οι περιοχές 5' και 3' UTR με μπεζ χρώμα, οι γραμμές υποδηλώνουν το μάτισμα των εξωνίων σε mRNA. **C:** Η εισαγωγή ενός ρετροτρανσποζονίου σε ένα εξώνιο ενός γονιδίου, συνήθως οδηγεί στην διακοπή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ο αστερίσκος συμβολίζει το νέο κωδικώνιο τερματισμού). Εντούτοις ακόμη και η εισαγωγή σε ένα ιντρόνιο μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις- πχ. να παρακαμφθεί ένα εξώνιο, ή τη δημιουργία ενός νέου εξωνίου, το οποίο επίσης συνήθως διακόπτει την έκφραση μιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Η εισαγωγή ρετροτρανσποζονίων αποτελεί μια τεκμηριωμένη αιτία ποικίλων κληρονομικών ασθενειών. Πιο συχνές είναι οι μεσολαβούμενες από τα L1 ενθέσεις των Alu.. **D:** τα L1 έχουν σχετικά ένα ασθενές σήμα πολυαδενηλίωσης, οδηγώντας στη μεταγραφή πέραν του σήματος (3' transduction). **E:** Η εισαγωγή ενός ρετροτρανσποζονίου συχνά μπορεί να συνοδεύεται από ανακατατάξεις στο DNA. Εδώ δείχνεται η απαλοιφή του πράσινου τμήματος και αναστροφή του κόκκινου τμήματος που περιέχει ένα εξώνιο, με την ακόλουθη απαλοιφή του εξωνίου κατά το μάτισμα. **F:** Ο υποκινητής των L1 μπορεί να προωθεί την μεταγραφή γειτονικών γονιδίων ανοδικά ή καθοδικά από το ίδιο.

Επιπρόσθετα, πέραν των γεγονότων μεταλλαξιγένεσης που μπορεί να προκληθούν από τη ρετρομετάθεση, μελέτες βασιζόμενες σε κυτταροκαλλιέργειες αποδεικνύουν πειστικά ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ORF2p μπορεί επίσης να είναι μεταλλαξογόνα. Η ρετροτρανσποζονιακή πρωτεΐνη ORF2p με ενεργότητα ενδονουκλεάσης, έχει συσχετιστεί με την πρόκληση θραύσεων στο DNA (30, 48, 49) και μεγάλων εκτάσεων γενωμικών διαγραφών (37). Επίσης πρόσφατη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα προστάτη συσχετίζει ότι η δράση της ORF2p ως ενδονουκλεάση εμπλέκεται, σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες δέσμησης-DNA, σε μη τυχαίες ογκογόνες μεταθέσεις DNA στα κύτταρα (50).

Επίσης, έχει προταθεί ότι η δράση των L1 ενισχύει το σήμα ετεροχρωματοποίησης οδηγώντας στην αδρανοποίηση του ενός X χρωμοσώματος σε κάθε θηλυκό εμβρυικό κύτταρο (51, 52).

Τέλος, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο υποκινητής των L1 μπορεί να προωθεί την μεταγραφή πέραν του εαυτού του και γειτονικών γονιδίων ανοδικά ή καθοδικά από το ίδιο (Εικόνα 1.5 F).

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται πολλά παραδείγματα παθολογικών καταστάσεων (> 100 ασθενειών) από κληρονομούμενες ή αυθόρμητες μεταλλάξεις που προκαλούνται από νέες ενθέσεις L1s, συμπεριλαμβανομένου γενετικών ασθενειών που οφείλονται από γεγονότα ρετρομετάθεσης στην γαμετική σειρά (germline), όπου τα L1s είναι πιο ενεργά, καθώς και καρκίνοι ως αποτέλεσμα σπάνιων σωματικών μεταλλάξεων (21, 53). Παραδείγματα γενετικών ασθενειών που έχουν συσχετιστεί με τη ρετρομετάθεση, πέραν του καρκίνου, αποτελούν ο διαβήτης και η αιμοφιλία (54-56).

1.4.1.3 Τα μεταθετά στοιχεία LINE - καρκινογένεση

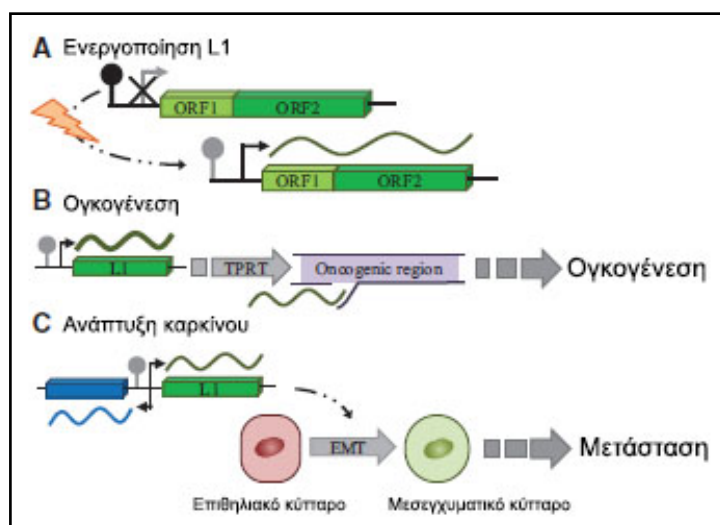
Είναι ενδιαφέρον ότι η προκαλούμενη από ενθέσεις των L1 μεταλλαξιγένεση, έχει παρατηρηθεί σε όγκους (57), σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (58-60) και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (61-63). Η ρετρομετάθεση των L1 εμφανίζεται τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα σωματικά κύτταρα (64), παράγοντας μωσαϊκισμούς και εν δυνάμει ογκογόνες μεταλλάξεις. Δεδομένου των σημαντικών, κυρίως επιβλαβών, επιπτώσεων των νέων L1 ενθέσεων κατά την γονιδιακή έκφραση του

ξενιστή (34, 65) θεωρείται ότι οι ενθέσεις αυτές είναι πιθανό να αποτελούν μια βάση μεταλλάξεων με αντίκτυπο την ογκογένεση.

Η πρώτη επιτυχής ανακάλυψη που υποδεικνύει ότι τα ρετροτρανσποζόνια L1 ως γενετικά μεταθετά στοιχεία δύνανται να προκαλέσουν μια σωματική μετάλλαξη, πραγματοποιήθηκε το 1988 μετά την ανακάλυψη ανακατατάξεων και την ενσωμάτωση ενός L1 στο ιντρόνιο-2 του ογκογονιδίου c-myc σε αδενοκαρκίνωμα μαστού (breast ductal adenocarcinoma) (66). Η δεύτερη επιτυχής χαρτογράφηση μιας νέας ενσωμάτωσης L1 σε ένα όγκο έγινε το 1992 από το Miki και τους συνεργάτες του που ανακάλυψαν μια ένθεση του στοιχείου L1 στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC (Adenomatous Polyposis Coli) από ένα ασθενή καρκίνου παχέος εντέρου (57). Λόγω του ότι το γονίδιο APC αποτελεί το κατεξοχήν ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο καρκίνο του παχέος εντέρου που προκαλεί την οικογενή αδενωμάτωση πολυποδίαση (67, 68), είναι λογικό να συμπεράνουμε ότι σε αυτή την περίπτωση, μια και μόνο L1 ενσωμάτωση θα μπορούσε να είναι επαρκής για να οδηγήσει σε ογκογένεση (57). Πρόσφατα, η εισαγωγή νέων μεθόδων ανάλυσης και αλληλούχισης (targeted next-generation sequencing) διευκόλυναν την ανακάλυψη επιπρόσθετων σωματικών ρετρομεταθέσεων των L1 στον καρκίνο παχέος εντέρου (65, 69) όπως επίσης και στους καρκίνους πνεύμονα (70), προστάτη (65) και ωοθηκών (65).

Ένα άλλο στοιχείο που τεκμηριώνει την εμπλοκή των L1 στην ογκογένεση είναι το γεγονός της ανεύρεσης σε όγκους υψηλών επιπέδων ελευθέρων ριζών, που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες (71) συνάμα με την παρατήρηση ότι το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται να αυξάνει την επαγωγή της ρετρομετάθεσης των L1 (72). Το οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA εμφανίζονται σαν μέρος της γήρανσης και μπορούν να αυξήσουν την χρωμοσωμική αστάθεια και την ενεργότητα των ρετροτρανσποζονίων (73), συμβάλλοντας έτσι στον συσχετιζόμενο με την εξέλιξη του καρκίνου γενωμικό μωσαϊκισμό (74, 75). Ως εκ τούτου, παίρνοντας σαν δεδομένο ότι η ρετρομετάθεση είναι μια στοχαστική διαδικασία και ότι τα περισσότερα σωματικά κύτταρα εμφανίζουν μια βασική ενεργότητα ρετρομετάθεσης, είναι εύλογο ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες αυξάνουν την πιθανότητα μια νέας ένθεσης L1 σε μια ογκογόνα περιοχή, οδηγώντας στην έναρξη νεοπλασίας (76).

Μέχρι σήμερα η ανάλυση διάφορων τύπων καρκίνου αποκάλυψε την ενσωμάτωση στοιχείων L1 σε σωματικά κύτταρα μόνο σε καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης (57, 65, 69, 70, 77). Μία πιθανή εξήγηση, για την παρατήρηση αυτή, είναι ότι τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν πλαστικότητα περισσότερο από τα άλλα διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα όγκων. Τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να μετασχηματιστούν ώστε να παράξουν καρκινικά βλαστικά κύτταρα (78) καθώς επίσης και να επαναπρογραμματιστούν σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μέσω της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάπτωσης (79, 80). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μετάσταση επιθηλιακών καρκίνων θεωρείται να εμπλέκει κύτταρα τα οποία έχουν χάσει τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους και έχουν αποκτήσει ένα μεταναστευτικό φαινότυπο μέσω της EMT. Επί τούτου και βάσει της κυτταρικής πλαστικότητας των ενυπάρχοντων σε επιθηλιακούς όγκους καρκινικών βλαστικών κυττάρων, έχει προταθεί η υπόθεση ότι η πλαστικότητα που παρουσιάζουν κάποια επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να τροφοδοτεί όγκους με μεγαλύτερη επιθετικότητα και εξελικτική ευελιξία (Εικόνα 1.6) (81).

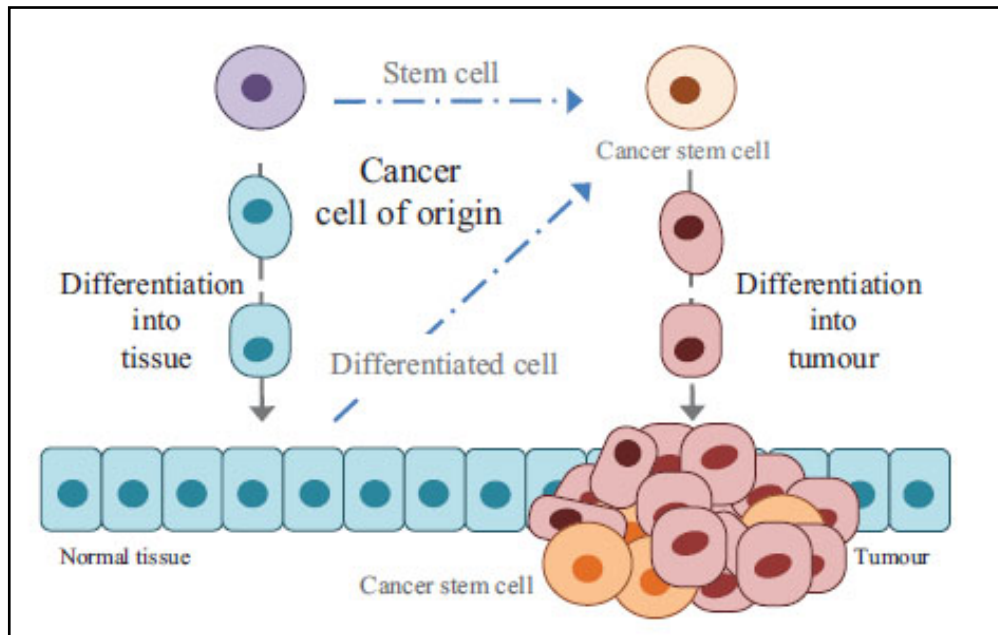


Εικόνα 1.6: Η υπόθεση εμπλοκής των L1 στην ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου. (A) Περιβαλλοντικοί παράγοντες αρχικά προκαλούν αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης στον υποκινητή των L1 των κυττάρων ενεργοποιώντας την μεταγραφή των πλήρους μεγέθους ρετροτρανσποζονίων L1. (B) Το γεγονός αυτό ακολουθείται από μια νέα (de novo) ενσωμάτωση του L1 σε μια ογκογενετική θέση, οδηγώντας στην ογκογένεση. (C) Μόλις δημιουργηθεί ο όγκος, ο υποκινητής του L1 είναι όλο και περισσότερο υπομεθυλιωμένος και δυναμικά ικανός να ενεργοποιεί γειτονικά γονίδια από τον ανάστροφο υποκινητή (antisense promoter). Επιπλέον, η υπομεθυλίωση στον υποκινητή του L1 εμφανίζεται να συσχετίζεται με την EMT και τελικά στην μετάσταση.

Το ερώτημα πώς ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό βλαστικό κύτταρο *in vitro* παραμένει αδιευκρίνιστο, ένα πεδίο που θα συζητηθεί σε επόμενη ενότητα. Δύο πιθανά σενάρια είναι ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα προκύπτουν είτε από τα υπάρχοντα βλαστικά κύτταρα του ιστού είτε από διαφοροποιημένα κύτταρα (Εικόνα 1.7). Στην πρώτη περίπτωση, ένα βλαστικό κύτταρο μπορεί να υποστεί μια ογκογόνα μετάλλαξη ή βλάβη που μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός καρκινικού κυττάρου παρά σε ένα φυσιολογικό διαφοροποιημένο κύτταρο (82). Στην δεύτερη περίπτωση, μια ογκογόνα μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει τον επαναπρογραμματισμό ενός διαφοροποιημένου κυττάρου σε καρκινικό (83). Δεδομένου ότι τα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα και επαναπρογραμματίζονται και επιπλέον με το γεγονός ότι μέχρι σήμερα έχουν αποδειχθεί μεταθέσεις των L1 μόνο σε επιθηλιακούς όγκους, είναι δελεαστική η υπόθεση ότι αυτού του τύπου οι καρκίνοι προκύπτουν από επαναπρογραμματισμένα διαφοροποιημένα κύτταρα, παρά από τους υπάρχοντες πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων του ιστού (76). Παρόλο που δεν έχει αξιολογηθεί η ενεργότητα των L1 στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, έχει βρεθεί ότι ρετρομεταθέσεις των L1 συμβαίνουν σε διάφορα άλλα βλαστικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου των εμβρυικών και προγονικών νευρικών κυττάρων (61, 63). Πράγματι, ο καθοδηγούμενος επαναπρογραμματισμός των επιθηλιακών κυττάρων *in vitro* για την απόκτηση επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων ενεργοποιεί την μετάθεση των L1 (84). Έτσι, παρόλο που οι σχέσεις μεταξύ καρκινικών βλαστικών κυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων και ρετρομετάθεσης των L1 είναι κατά κάποιο τρόπο έμμεσες, προτείνεται ότι η πλαστικότητα που παρουσιάζουν οι επιθηλιακοί όγκοι εξηγούν την ειδική τους υποστήριξη για ρετρομετάθεση των L1, αυξάνοντας την πιθανότητα ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα περιέχουν προερχόμενες από τα L1 ογκογόνες μεταλλάξεις ή τουλάχιστον επιτρέπουν την ενεργότητα των L1 (76).

Συνοψίζοντας, η μεσολαβούμενη από τα L1 μεταλλαξιγένεση μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στον καρκίνο, μια ασθένεια που καθοδηγείται από μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα (76). Πράγματι, η ιδέα της εμπλοκής της ρετρομετάθεσης στην καρκινογένεση δεν είναι καινούρια (21, 28, 57). Πολυάριθμοι καρκίνοι παρουσιάζουν έντονη ενεργοποίηση των L1 (33, 65, 69, 70, 77, 85-87). Παρ' όλα αυτά, ένα μεγάλο εύρος σημείων-κλειδιών δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί, συμπεριλαμβανομένου των πιο

προφανών ερωτηματικών του πότε η ρετρομετάθεση των L1 προκαλεί καρκίνο ή το αντίστροφο (76).



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της ογκογένεσης των επιθηλιακών καρκίνων. Ένα βλαστικό κύτταρο υπόκειται σε διαφοροποίηση, δίνοντας γένεση σε ένα φυσιολογικό ιστό. Εάν εμφανιστεί μια μετάλλαξη σε κάποια ογκογόνα περιοχή, ένα φυσιολογικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να μετατραπεί σε καρκινικό βλαστικό κύτταρο. Αυτό το καρκινικό βλαστικό κύτταρο μπορεί επίσης να παραχθεί από διαφοροποιημένα κύτταρα μέσω της EMT. Ακολούθως τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν στους διάφορους κυτταρικούς τύπους που απαρτίζουν ένα όγκο.

1.5 LTR Ρετροτρανσποζόνια [Ενδογενείς ρετροϊοί (ERVs)] - Μηχανισμός ρετρομετάθεσης

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια συνιστούν το 8.55% του ανθρώπινου γονιδιώματος (5) και το 9.87% του γονιδιώματος του ποντικού (6). Αποτελούνται κυρίως από ενδογενείς ρετροϊούς (ERVs), οι οποίοι έχουν εισαχθεί στο γονιδίωμα με οριζόντια μεταφορά κατά την εξέλιξη για εκατομμύρια χρόνια μέσω αρχέγονων μολύνσεων της γαμετικής σειράς από εξωγενείς ρετροϊούς (3, 88, 89). Ως επακόλουθο, τα LTR ρετροτρανσποζόνια σχετίζονται δομικά και φυλογενετικά με τους ρετροϊούς, με τη διαφορά ότι οι τελευταίοι φέρουν: α. επιπρόσθετα γονίδια που κωδικοποιούν για ένα γλυκοπρωτεϊνικής δομής φάκελο (Env) που αναγνωρίζεται από τους μεμβρανικούς υποδοχείς του ξενιστή και έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της διαδικασίας μόλυνσης

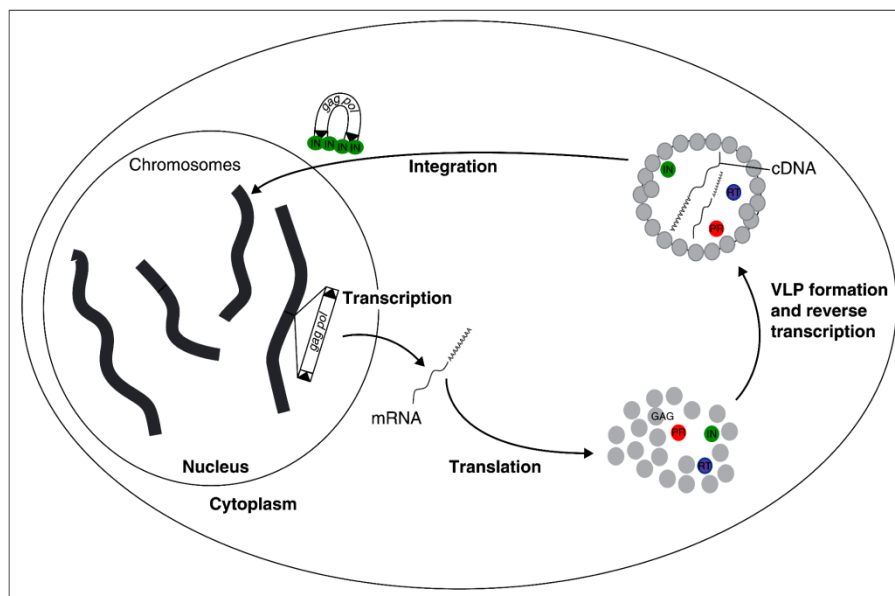
καθώς και β. γενωμικά συστατικά απαραίτητα για τη δημιουργία λειτουργικής ιϊκής κάψας (3, 14).

Τα μεταθετά αυτά στοιχεία φέρουν στα δύο άκρα τους δύο μακρές τελικές επαναλήψεις (LTR), οι οποίες διευθετούνται στην ίδια μεταγραφική κατεύθυνση και πλαισιώνουν το κωδικοποιό τμήμα του στοιχείου (3) (Εικόνα 1.1). Τα LTR είναι απαραίτητα για τη μεταγραφή και την ενσωμάτωση του cDNA μετά από την αντίστροφη μεταγραφή του ενδιάμεσου RNA, καθώς περιέχουν ρυθμιστικές μεταγραφικές αλληλουχίες. Αποτελούνται από τρεις περιοχές: την περιοχή U3 η οποία περιέχει στοιχεία ενισχυτών και υποκινητών, την περιοχή R και την περιοχή U5 (90, 91). Οι περιοχές R και U5 είναι περισσότερο συντηρημένες αλληλουχίες συγκριτικά με την περιοχή U3 (91). Η υψηλότερη μεταβλητότητα που παρατηρείται στην περιοχή U3 μπορεί να οφείλεται σε λόγους προσαρμογής στο περιβάλλον των διάφορων ιστών.

Στα αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια, η περιοχή που κωδικοποιεί για την αντίστροφη μεταγραφάση βρίσκεται μέσα σε ένα μεγάλο πλαίσιο ανάγνωσης που ονομάζεται *pol*, και κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη με ενεργότητες πρωτεάσης (απαραίτητη για την μετα-μεταφραστική επεξεργασία των ρετροτρανσποζονιακών πρωτεϊνών), ριβονουκλεάσης H (απαραίτητη για την αποικοδόμηση της αλυσίδας RNA στο ετεροδιμερές DNA /RNA) και ιντεγκράσης (απαραίτητη για την ενσωμάτωση του δίκλωνου cDNA μετά από την αντίστροφη μεταγραφή). Ανοδικά του *pol* βρίσκεται ακόμη ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που καλείται *gag*. Το *gag* συχνά επικαλύπτεται μερικώς με το *pol* και κωδικοποιεί μια δομική πρωτεΐνη με ενεργότητα δέσμευσης νουκλεϊνικού οξέος, απαραίτητη για την συγκρότηση των μορίων RNA σε κυτταροπλασματικά ψευδοϊκά σωματίδια (92, 93).

Σε ένα πρώτο στάδιο του μηχανισμού μετάθεσης των LTR ρετροτρανσποζονίων, προάγεται η μεταγραφή ενός μορίου RNA του ρετροτρανσποζονίου από την πολυμεράση II του κυττάρου ξενιστή και ένα υποκινητή που εντοπίζεται στο 5'LTR (Εικόνα 1.2). Στη συνέχεια, το RNA μεταγράφεται στο κυτταρόπλασμα παράγοντας τις απαραίτητες πρωτεΐνες για το σχηματισμό ψευδοϊκών σωματιδίων (*virus-like particle, VLP*), ή/και υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή για παραπέρα ενσωμάτωση του νέου αντίγραφου στο γονιδίωμα. Τυπικά, δύο μόρια RNA πακεττώνονται σε ψευδοϊκά σωματίδια, ακολουθεί

η αντίστροφη μεταγραφή, που πριμοδοτείται με την υβριδοποίηση ενός tRNA στην νουκλεοτιδική ακολουθία έναρξης της αντίστροφης μεταγραφής (*primer-binding site, PBS*) κοντά στο 5'LTR. Το παραγόμενο ατελές cDNA μεταφέρεται στο 3'LTR για την ολοκλήρωση της μιας αλυσίδας DNA. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της μίας αλυσίδας DNA, το υπόστρωμα RNA αποδομείται από την ενεργότητα ριβονουκλεάσης H της αντίστροφης μεταγραφάσης, αφήνοντας ανέπαφη την πολυουρινική περιοχή PPT του ρετροτρανσποζονιακού RNA που βρίσκεται ανοδικά του 3' LTR και η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την έναρξη αντιγραφής της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται ακόμη μια μεταφορά αλυσίδας ώστε να αντιγραφεί πλήρως η συμπληρωματική αλυσίδα DNA και να παραχθεί το πλήρους μεγέθους αντίγραφο DNA. Τέλος το παραγόμενο αντίγραφο DNA ενσωματώνεται σε μια νέα θέση στο γένωμα (93).



Εικόνα 1.8: Ο μηχανισμός μετάθεσης των LTR ρετροτρανσποζονίων

Τα μη αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια, γενικά διατηρούν την δομή των LTR και την πριμοδοτική ακολουθία έναρξης της αντίστροφης μεταγραφής (*primer-binding site, PBS*) αλλά είναι ελλειμματικά για μερικές ή για όλες τις κωδικεύουσες ιδιότητες. Τα περισσότερα από αυτά τα ελλειμματικά ή αναδιαταγμένα στοιχεία αποτελούν αδρανοποιημένα ψευδογονίδια και αντιπροσωπεύουν αρχέγονα γεγονότα

ρετρομετάθεσης. Εντούτοις, κάποια είναι ικανά να εκμεταλλεύονται τις παραγόμενες από τα αυτόνομα στοιχεία πρωτείνες, trans-δρώντες παράγοντες που απαιτούνται για τη μετάθεση, συμβάλλοντας στην αριθμητική ενίσχυση αντιγράφων των μη αυτόνομων στοιχείων στο γένωμα (14).

Τέλος, τα LTR ρετροτρανσποζόνια κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τάξεις. Συγκεκριμένα στις τάξεις I, II, III που αποτελούνται από τους ενδογενείς ρετροϊούς και τα MaLR, μια κατηγορία LTR ρετροτρανσποζονίων με περιορισμένες ομοιότητες ως προς τα ρετροϊικά γονίδια (94). Στον ποντικό τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης I φέρουν ομοιότητες με τους ρετροϊούς τύπου C, συνιστούν περίπου το 0.7% του γενώματος (6) και αποτελούνται κυρίως από στοιχεία που σχετίζονται με τον ρετροϊό της λευχαιμίας ποντικού (MoMLV) (95, 96). Τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης II (IAP, ETn και MusD) ομοιάζουν με τους τύπου B ρετροϊούς, συνιστούν το 3% (6) του γενώματος του ποντικού και σχετίζονται με τον ογκογόνο ιό του μαστού του ποντικού MMTV (96, 97). Τέλος, στη τάξη III των LTR ρετροτρανσποζονίων ποντικού, περιλαμβάνονται κάποια ενεργά ERVs (οικογένεια MuERV-L) καθώς επίσης σε αυτή την κατηγορία, συγκαταλέγονται και τα μη αυτόνομα στοιχεία ORR1 και τα MT MaLR (96). Η τάξη III αποτελεί περίπου το 5.4% του γενώματος του ποντικού (6) που συμβάλλει σημαντικά στο πρώιμο τρασκριπτόσωμα του ποντικού (early mouse transcriptome) (98) και επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση (96).

Αν και στο γονιδίωμα των θηλαστικών εμπεριέχεται μια ποικιλία LTR ρετροτρανσποζονίων, μόνο οι ενδογενείς ρετροϊοί (*endogenous retroviruses, ERVs*), εμφανίζονται να είναι ενεργοί (13, 94). Οι περισσότερες αλληλουχίες που προέρχονται από τα LTR ρετροτρανσποζόνια περιέχουν μονά LTR, προκύπτουν από ανασυνδιασμό μεταξύ των LTRs και έχουν απολέσει τις εσωτερικές αλληλουχίες του στοιχείου (90). Τα LTR περιέχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες όπως υποκινητές, σήματα πολυαδενυλίωσης και ενισχυτές και ως εκ τούτου μπορούν να επηρεάζουν δραματικά την έκφραση RNA ρετροτρανσποζονιακών ή μη αλληλουχιών (90). Λόγω της επίδρασή τους στη γονιδιακή ρύθμιση, αυτά τα απομεινάρια μεταθετών στοιχείων μπορούν να συμβάλλουν στη γενετική ποικιλομορφία ακόμα και αν το στοιχείο δεν είναι πλέον παρόν (1).

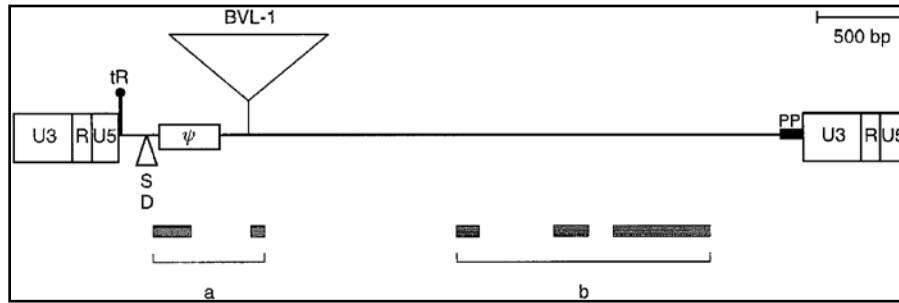
Αξίζει να σημειωθεί ότι, στον άνθρωπο τα ενεργά LTR ρετροτρανσποζόνια HERV (*human endogenous retrovirus*) στην αυθεντική τους μορφή 5'LTR-gag-pro-pol-env-

3'LTR είχαν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται στο γένωμα αυτόνομα. Εντούτοις, σε αντίθεση με το γένωμα του ποντικού όπου περιέχονται ενεργά LTR ρετροτρανσποζόνια, θεωρείται ότι όλα τα HERV τη σημερινή εποχή έχουν υποστεί ποικίλες μεταλλάξεις κατά την εξέλιξη οι οποίες τα έχουν καταστήσει ανίκανα αναδιπλασιασμού στο ανθρώπινο γένωμα (89).

Εισαγωγές των ERVs σε ένα ιντρόνιο μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά που οφείλονται στη διακοπή της γονιδιακής έκφρασης μέσω πρώιμης πολυαδενυλίωσης, ανώμαλου ματίσματος ή εκτοπικής μεταγραφής που καθοδηγούνται από τα LTR των ENVs (96). Οι πιο συχνές επιπτώσεις που έχουν αναφερθεί για τις εισαγωγές, έπειτα από ρετρομετάθεση των στοιχείων ETn και IAP, οφείλονται σε πρώιμες πολυαδενυλίώσεις και ανώμαλο ματίσματος από σήματα πολυαδενυλίωσης και θέσεις ματίσματος στην αλληλουχία των εν λόγω ρετροτρανσποζονίων (96). Όσο αφορά τις νέες ενθέσεις των ETn και IAP, έχει αναφερθεί ότι οδηγούν σε πρώιμη πολυαδενυλίωση των γονιδίων ή σε ανώμαλο μάτισμα.

1.6 Τα ρετροτρανσποζόνια VL30, ένας ασυνήθιστος τύπος LTR-ρετροτρανσποζονίων και η εμπλοκή τους στην καρκινογένεση

Τα στοιχεία VL30 αποτελούν μια οικογένεια ρετροτρανσποζονίων που απαντά στο γονιδίωμα του ποντικού και αποτελείται από 150-200 μέλη (99, 100). Πρόκειται για στοιχεία μοριακού μεγέθους 5-6Kb και δομικά ομοιάζουν με την τυπική δομή των ρετροϊών (101). Φέρουν δύο μακρές τελικές επαναλήψεις (LTRs) μεγέθους 570bp που πλαισιώνουν τα γονίδια gag, pol και env (Εικόνα 1.9). Κατηγοριοποιούνται σε 4 ομάδες, βάσει διακριτών συντηρημένων αλληλουχιών (μοτίβων) στη περιοχή U3, γνωστών για την εμπλοκή τους στην ιστοειδική μεταγραφική ρύθμιση (U3I, U3II, U3III, U3IV) (100). Μετά από μελέτες ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων δύο αντιπροσωπευτικών μελών των στοιχείων VL30: BVL-1 (101) και NVL-3/9 (102), αποκαλύφθηκε η ύπαρξη πολλαπλών κωδικονίων τερματισμού (101, 102) που πιστοποίησε την έλλειψη λειτουργικών ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης για τα γονίδια gag, pol και env. Το γεγονός αυτό καθιστά τα στοιχεία αυτά ανίκανα να κωδικοποιούν τις απαραίτητες για την ρετρομετάθεση πρωτεΐνες, κατατάσσοντάς τα στα μη αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια.



Εικόνα 1.9: Δομικά χαρακτηριστικά στοιχείων VL30: Αναπαρίσταται η δομική οργάνωση του στοιχείου NVL-3. Δύο LTR αλληλουχίες (5'-U3-R-U5-3') πλαισιώνουν το εσωτερικό νουκλεοτιδικό τμήμα του στοιχείου. Καθοδικά του 5'LTR υπάρχει μια ακολουθία συμπληρωματική με το 3' άκρο ενός ειδικού tRNA, (tR), και μια πολυουρινική περιοχή (PP) ανοδικά του 3'LTR, απαραίτητες για την αντίστροφη μεταγραφή. Σημειώνονται οι θέσεις δότη ματίσματος (SD) και σήματος πακεταρίσματος Ψ. Το στοιχείο NVL-3 δεν φέρει ακολουθίες που κωδικοποιούν λειτουργικές ρετροϊικές πρωτεΐνες. Σημειώνονται, μικρές περιοχές αμινοξικής ομολογίας με τις πρωτεΐνες gag (a) και pol (b) του ρετροϊού MoMLV. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι κοινά με το στοιχείο BVL-1 το οποίο φέρει μια επιπρόσθετη περιοχή 850bp.

Το τυπικό μεταγράφημα των στοιχείων VL30 είναι ένα RNA των 30S, που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Συχνά πακετάρεται σε τύπου-C σωματίδια ρετροϊών σχηματίζοντας εγκαψιδιωμένα ψευδοϊικά σωματίδια ικανά να μεταφέρουν μεταγραφήματα VL30 και να μολύνουν ετερόλογα κύτταρα (103). Η ιδιότητα αυτή των στοιχείων VL30, αν και είναι ένα διαδεδομένο φαινόμενο στο κύκλο ζωής των ρετροϊών, αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της οικογένειας των στοιχείων VL30 που τα διαχωρίζει από τις υπόλοιπες οικογένειες ρετρομεταθετών στοιχείων.

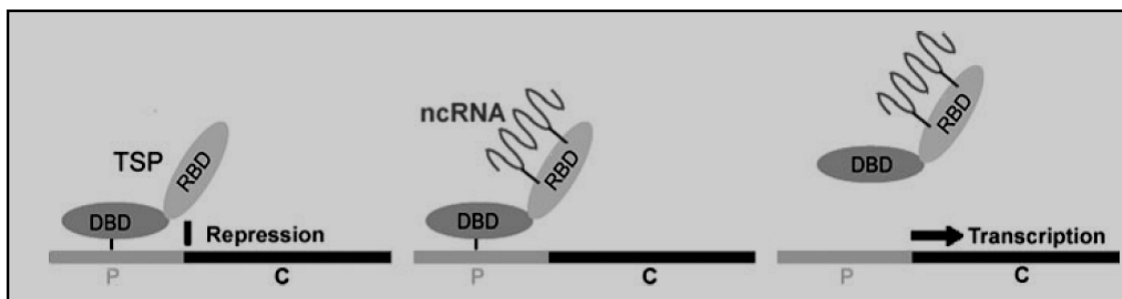
Μια άλλη σημαντική ιδιότητα των στοιχείων VL30 είναι η ρύθμιση της έκφρασής των μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως φάνηκε μετά από μελέτες σε κυτταρικά μοντέλα. Υπεύθυνη για τις διάφορες μεταγραφικές αποκρίσεις των στοιχείων VL30 θεωρείται η περιοχή U3 LTR (99, 100). Η έκφραση των στοιχείων VL30 μπορεί να επαχθεί από τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια Has-ras και N-ras, από τον ρετροϊό Simian virus 40 (SV40), τον επιδερμικό αναπτυξιακό παράγοντα (EGF) και πλήθος από διάφορα άλλα ερεθίσματα όπως μετά από επίδραση με βαρέα μέταλλα (βανάδιο (104) ή αρσενικό (105)) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (106), γεγονός που τα κατατάσσει στα πρώιμα γονίδια απόκρισης τα οποία μπορούν να σηματοδοτούν δευτερογενή και τριτογενή

μονοπάτια κυτταρικών αποκρίσεων (99). Ακόμη, παρατηρήθηκε ένα ιστο- και χρονο-ειδικό πρότυπο έκφρασης των στοιχείων VL30 μετά από μελέτες σε κυτταρικές σειρές αιματοποιητικής προελεύσεως (107) και κατά τα αναπτυξιακά στάδια σε έμβρυα μυός (108). Εντούτοις, ο φυσιολογικός ρόλος των στοιχείων VL30 παραμένει ουσιαστικά άγνωστος.

Ακόμη, μελέτες (109, 110) απέδειξαν ότι η πρόκληση εγκεφαλικής ισχαιμίας σε ποντίκια επάγει υψηλή έκφραση των VL30, των οποίων τα μεταγραφήματα ανιχνεύθηκαν ισχυρά προσδεδεμένα σε πολυριβοσώματα. Στα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκε επίσης καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Μετά από σύγκριση του προφίλ έκφρασης των θεωρητικά πρώιμων επαγόμενων στοιχείων VL30 με αυτού του άμεσα πρώιμου γονιδίου *c-fos* υπό συνθήκες στρες, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *c-fos* παρουσιάζει ένα τυπικό πρότυπο έκφρασης ενός επαγόμενου γονιδίου έπειτα από στρες (*stress-induced genes*). Σε αντίθεση τα στοιχεία VL30, επάγονται κατά πολύ αργότερα συγκριτικά με το γονίδιο *c-fos*, υποστηρίζοντας ότι η έκφρασή των VL30 δεν αποτελεί αποτέλεσμα κυτταρικού στρες αλλά σχετίζεται με την έναρξη καθυστερημένου νευρωνικού κυτταρικού θανάτου. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τον ρόλο των στοιχείων VL30, ως αρνητικών ρυθμιστών της μετάφρασης υπό συνθήκες κυτταρικού στρες, επάγοντας κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα μια εργασία του εργαστηρίου μας ενισχύει περαιτέρω τη συμβολή των στοιχείων VL30 στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (111). Συγκεκριμένα, το επαγόμενο από την ρετρομετάθεση των VL30 μονοπάτι κυτταρικού θανάτου είναι ανεξάρτητο κασπασών, ενώ συνδέεται με την επαγωγή της πρωτεΐνης p53 και μεσολαβείται από βλάβες στα μιτοχόνδρια και λυσοσώματα. Τα δεδομένα αυτά αποκαλύπτουν ένα ρόλο της ρετρομετάθεσης των VL30, ως πυρηνικού σήματος ενεργοποίησης των μιτοχονδρίων και λυσοσωμάτων με τελικό επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο.

Ιδιαίτερης σημασίας, αποτελεί η συσχέτιση της ενεργοποίησης των στοιχείων VL30 με την επιγενετική ρύθμιση. Σε συγκεκριμένη μελέτη, προτείνεται ένα μοντέλο όπου η ταυτόχρονη ακετυλίωση και φωσφορυλίωση μέσω του μονοπατιού MAP κινασών, της ιστόνης H3, συνεργάζονται στην μεταγραφική επαγωγή των στοιχείων VL30 σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού. (112). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η δράση διάφορων μεταθετών στοιχείων ρυθμίζεται από διακριτές τροποποιήσεις στην χρωματίνη

και ειδικότερα η φωσφοροακετυλίωση της ιστόνης H3 εμφανίζεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση των ρετροτρανσποζονίων VL30.



Εικόνα 1.10: Αναπαράσταση του μηχανισμού αντιστρεπτής γονιδιακής ρύθμισης μέσω ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (TSP) και ενός μη κωδικοποιού RNA (ncRNA). Μια πρωτεΐνη TSP φέρει μια θέση δέσμησης DNA (DBD) στον υποκινητή ενός γονιδίου P που καταστέλλει την μεταγραφή του, καθώς και δύο θέσεις δέσμησης RNA (RBD) στις οποίες δεσμεύονται μη κωδικοποιά RNA, όπως το RNA των στοιχείων VL30 και απελευθερώνουν την TSP από το γονίδιο ενεργοποιώντας την μεταγραφή του.

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση των ρετροτρανσποζονίων VL30 ενισχύει το μεταστατικό δυναμικό κυττάρων ανθρώπινου μελανώματος, πιθανά μέσω της ρετρομετάθεσης και εισαγωγής των στοιχείων VL30 σε θέσεις στο γένωμα διακόπτοντας ή επάγοντας την δράση σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκογένεση (103). Ακόμη το γεγονός ότι το VL30 cDNA ενσωματώνεται σε διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές στους μεταστατικούς κλώνους μελανώματος, που προέκυψαν στην συγκεκριμένη μελέτη, προτείνει ότι η μετάσταση δεν οφείλεται αυτή καθαυτή στην ενσωμάτωση ενός VL30 cDNA στο γονιδίωμα, αλλά στην έκφραση ενός VL30 RNA, ένα απρόσμενο γεγονός καθότι το RNA στερείται σημαντικού κωδικοποιού δυναμικού για μια λειτουργική πρωτεΐνη. Επίσης βρέθηκε ότι το RNA των στοιχείων VL30 σχηματίζει σύμπλοκο με τον PSF (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor), μια κατασταλτική πρωτεΐνη, που αποτελεί συστατικό των σωματιδίων ματίσματος. Ο PSF φέρει μια θέση δέσμησης DNA (DNA-binding domain, DBD), η οποία βοηθά την δέσμηση του στο DNA, σε θέσεις υποκινητών γονιδίων και κατά συνέπεια οδηγεί στην καταστολή ογκογονιδίων ή άλλων γονιδίων. Επίσης φέρει και δύο θέσεις δέσμησης ειδικές για RNA (RNA-binding domain, RBD), όπου δεσμεύεται το RNA των στοιχείων VL30 (113, 114). Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο VL30-PSF οδηγεί στην απελευθέρωση του PSF από το DNA, επάγοντας την μεταγραφή του προηγουμένως

κατεσταλμένου γονιδίου, διαδραματίζοντας ένα σημαντικό ρόλο σε αντιστρεπτή γονιδιακή ρύθμιση (Εικόνα 1.10). Με την επαγωγή της έκφρασης των υπό φυσιολογικές συνθήκες κατεσταλμένων ογκογονιδίων διαφαίνεται ο πιθανός ρόλος των στοιχείων VL30: α. στην ογκογένεση (114) και β. στη συμβολή του στο μονοπάτι στεροειδογένεσης καταστέλλοντας το πρώτο γονίδιο (P450_{scc}) έναρξης του εν λόγω μονοπατιού (115).

Τέλος, ενδιαφέρον αποτελεί το εύρημα πρόσφατης μελέτης, ότι οι πρωτεΐνες Trim24 και Trim33 καταστέλλουν συνεργιστικά την εξαρτώμενη από τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος δράση των VL30 στο συκώτι (116). Οι πρωτεΐνες Trim24 (Tif1a) και Trim33 (Tif1g) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους οδηγώντας στο σχηματισμό ενός συμπλόκου-καταστολέα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στο ποντίκι. Σε ηπατοκύτταρα με αποσιωπημένη την Trim24 (knockout), έχει παρατηρηθεί άρση της καταστολής των VL30 και συσσώρευση cDNA των VL30 μετά από αντίστροφη μεταγραφή στο κυτταρόπλασμα. Έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση αυτή των στοιχείων VL30, συνδέεται με την παραγωγή ιντερφερόνης που παράγεται ως άμυνα έναντι ιικών μολύνσεων, γεγονός που μιμείται την διαδικασία προ-νεοπλαστικής φλεγμονής του ανθρώπινου συκωτιού έπειτα από μόλυνση από εξωγενείς ιούς. Επίσης στην ίδια έρευνα έχει αποδειχθεί ότι κατά την άρση της καταστολής των VL30, τα LTR των VL30 δρουν ως υποκινητές και ενισχυτές απορυθμίζοντας την έκφραση γειτονικών γονιδίων και οδηγώντας στην παραγωγή μη κωδικοποιών (ενισχυτικών) RNAs (enhancer RNAs, eRNAs), τα οποία είναι απαραίτητα για την δράση των LTRs ως ενισχυτών σε ηπατοκύτταρα *in vivo*.

1.7 Ο ρόλος των Μεταθετών Στοιχείων

Τα μεταθετά στοιχεία περιέχουν στην αλληλουχία των βάσεων τους όλες τις οδηγίες που χρειάζονται για να αντιγραφούν από το DNA του ξενιστή τους και να ενσωματωθούν σε άλλο σημείο (9). Στην αξιοσημείωτη αυτή ιδιότητά τους να αυτοδιπλασιάζονται στο γονιδίωμα του ξενιστή τους, βασίστηκε ο χαρακτηρισμός τους από πολλούς επιστήμονες ως άχρηστο (junk DNA), παρασιτικό (parasite DNA) ή εγωιστικό DNA (selfish DNA) (3, 4), δίνοντας έμφαση στις επιβλαβείς επιπτώσεις της μετάθεσής τους αλλά και στο αμελητέο όφελος προς τον ξενιστή τους (117).

Σήμερα, η αντίληψη αυτή έχει αλλάξει από διάφορες παρατηρήσεις που υποστηρίζουν ότι τα μεταθετά στοιχεία, κάθε άλλο παρά άχρηστο DNA είναι αλλά αντιθέτως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομική και λειτουργική εξέλιξη των γονιδίων και κατ' επέκταση του γονιδιώματος ποικίλων οργανισμών (9, 13). Το γεγονός ότι κατά την εξέλιξη επικρατεί η τάση της απόρριψης οτιδήποτε άχρηστο και επιβλαβές για ένα είδος αντικατοπτρίζει τη σπουδαιότητα της εξελικτικής επιλογής στη διατήρηση των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα με την επινόηση στρατηγικών αποτροπής τους από ανεξέλεγκτες μεταθέσεις (7). Συγκεκριμένα μέσω της ανάλυσης του ανθρώπινου γονιδιώματος (*human genome project*), δόθηκαν περισσότερες πληροφορίες που αφορούν την λειτουργία των διάφορων συστατικών του γονιδιώματος, συμπεριλαμβανομένων της προέλευσης και του ρόλου των μη κωδικοποιών αλληλουχιών (4, 118), ωθώντας πολλούς ερευνητές να θεωρήσουν τα επαναλαμβανόμενα αυτά στοιχεία ως γονιδιωματικό θησαυρό (*genomic treasure*) (4, 119) και άξια περαιτέρω μελέτης.

Κατά την διάρκεια της μετάθεσης, ένα μεταθετό στοιχείο μπορεί να εισαχθεί σε γονίδια ή ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων διακόπτοντας τη σωστή γονιδιακή λειτουργία και ωθώντας μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις (12, 36, 37, 120, 121) με πιθανή πρόκληση κάποιας ασθένειας. Ακόμη εξυπηρετούν ως σημεία ανασυνδυασμού (*recombination hot spots*) (4), και μπορεί να αποκτούν ειδικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι ο έλεγχος της μετάφρασης πρωτεϊνών και η μεταγραφή γονιδίων, καθώς η ευρεία παρουσία πολύ παρόμοιων αλληλουχιών DNA μέσα στο γονιδίωμα υποκινεί τον ανασυνδιασμό ίσων όσο και άνισων ανασυνδυασμών (120, 122, 123), τμηματικών διπλασιασμών (*segmental duplication*) (124), μετατροπών γονιδίων (*gene conversion*) (125, 126), μεταθέσεων εξονίων (*exon shuffling*) (127) και χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (*chromosomal rearrangements*) (128).

Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία 96 γεγονότα ρετρομετάθεσης που οδηγούν σε ανθρώπινες μονο-γονιδιακές ασθένειες (25 L1, 60 Alu, 7 SVA, 4 polyA) (56). Ένα πρόσφατο παράδειγμα αποτελεί η ανακάλυψη 18 ενσωματώσεων ρετροτρανσποζονίων (14 Alu, 3 L1, 1 polyA) στην νευροϊνομάτωση τύπου 1, μια αναφορά που περιγράφει τα μέχρι σήμερα περισσότερα γεγονότα ρετρομετάθεσης, ως αιτίες πρόκλησης ασθένειας (129). Σημαντικό αποτελεί δε το γεγονός ότι σε

καλλιεργούμενα κύτταρα καρκινικών σειρών ανιχνεύονται υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης σε αντίθεση με τα περισσότερα πρωτογενή μη-μετασχηματισμένα κύτταρα¹⁵. Αν και οι ακριβείς λόγοι καταστολής της ρετρομετάθεσης στα φυσιολογικά κύτταρα παραμένουν άγνωστοι, είναι πιθανόν ότι οι μεταλλάξεις που προδιαθέτουν ένα κύτταρο να μετατραπεί σε καρκινικό να ενεργοποιούν επίσης γεγονότα ρετρομετάθεσης¹⁵. Είναι επίσης λογικό να υποθέσουμε ότι οι ενσωματώσεις των ρετροτρανσποζονίων πολλαπλασιάζονται κατά προτίμηση σε όγκους καθότι τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ταχύτερα από ότι τα φυσιολογικά κύτταρα προέλευσής τους (130). Πράγματι, ο κυτταρικός κύκλος αν και δεν είναι απολύτως αναγκαία προϋπόθεση για την παραγωγή ρετρομεταθέσεων, εντούτοις δύναται να αυξήσει τη συχνότητά της (64, 130).

Εντούτοις, ενώ μεμονωμένες ενσωματώσεις μπορεί να οδηγούν είτε σε ουδέτερες ή επιβλαβείς συνέπειες, η επικράτησή των μεταθετών στοιχείων μέσα στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα δείχνει ότι η παρουσία τους είναι επιλεκτικά συμφέρουσα (1) και δεν οδηγεί πάντοτε σε βλαβερές για το κύτταρο επιπτώσεις. Αντιθέτως, η μεταθετική δράση τους συμβάλει στην γενετική ποικιλομορφία ενός οργανισμού (9). Ενδιαφέρουσα είναι η αναφορά 9 περιπτώσεων έκφρασης γονιδίων, καθοδηγούμενης από τα LTR των ρετροτρανσποζονίων IAPs στο γένωμα του ποντικού. Πολλά από τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, η γονιδιακή έκφραση των οποίων καθοδηγείται από τα LTR των IAP, παρουσιάζουν μια ποικιλία έκφρασης σε γενετικά πανομοιότυπα ποντίκια (metastable epialleles) (131). Η παρατηρούμενη ποικιλία στην έκφραση οφείλεται στα επίπεδα μεθυλίωσης στη περιοχή 5'LTR. Εάν το 5'LTR είναι επί το πλείστον μεθυλιωμένο, ο υποκινητής που εντοπίζεται σε αυτό καθίσταται ανενεργός με αποτέλεσμα το γονίδιο να εκφράζεται ελάχιστα ή και καθόλου. Ωστόσο εάν το LTR είναι υπομεθυλιωμένο είναι δυνατή η εκτοπική γονιδιακή έκφραση από τον υποκινητή οδηγώντας στον μεταλλαγμένο φαινότυπο. Τέτοιες περιπτώσεις έχουν μελετηθεί από τον Whitelaw και τους συνεργάτες του, οι οποίοι έχουν προτείνει την ενδιαφέρουσα θεωρία ότι η φαινοτυπική ποικιλομορφία στα θηλαστικά μπορεί εν μέρει να οφείλεται στα διάφορα επίπεδα αποσιώπησης των ρετροτρανσποζονίων σε σωματικά κύτταρα (132). Προς αυτή την κατεύθυνση, ένας ακόμη αξιοσημείωτος ρόλος των LTR ρετροτρανσποζονίων είναι το γεγονός ότι οι LTR αλληλουχίες τους αποτελούν άφθονη πηγή υποκινητών και

ενισχυτών συμβάλλοντας έτσι σε ειδικά ανά είδος μεταγραφικά ρυθμιστικά δίκτυα (133). Παράδειγμα αποτελούν οι πολλαπλές θέσεις δέσμευσης για Oct4, Sox2 και Nanog, γεγονός που προσδίδει σημαντικές διαφορές στα δίκτυα πολυδυναμίας (pluripotency networks) σε ποντικίσια και ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (134).

Επιπρόσθετα, μετά την ανακάλυψη ότι τα στοιχεία LINE φέρουν μοτίβα υποκινητών και ενισχυτών, είναι φανερή η επίδραση που μπορεί να έχει η ενσωμάτωση τέτοιων στοιχείων στην γονιδιακή έκφραση (135). Όταν ένα μεταθετό στοιχείο εισέρχεται ανοδικά ενός γονιδίου, μερικές μικρές επαναλήψεις αλληλουχιών (μοτίβα) μπορούν να συντηρηθούν και μέσω φυσικής επιλογής (*selective pressure*) να παραμένουν ως μεταγραφικοί υποκινητές ή ενισχυτές (4). Πράγματι, κάποια μεταθετά στοιχεία έχουν προσαρμοσθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή και δρουν ως γονίδια ή ρυθμιστικά στοιχεία, αποτελώντας μια πηγή γενετικής καινοτομίας για τον οργανισμό (9). Την τελευταία δεκαετία έχουν περιγραφεί πολλά μεταθετά στοιχεία με την δυνατότητα να μπορούν να προσθέτουν ποικίλες λειτουργίες στα γονίδια-στόχους τους. Παραδείγματα όπως οι ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων του ξενιστή (*promoters, enhancers, silencers*), σινιάλα πολυαδενυλίωσης, κωδικοποιά εξώνια όπως πλήρη RNA γονίδια και ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης έχουν επανειλημμένα παραχθεί από μεταθετά στοιχεία κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (3). Το φαινόμενο αυτό καλείται μοριακή εξοικείωση ή προσαρμογή (*molecular domestication, ή exaptation ή co-option*)(136). Πολλές από αυτές τις αλληλουχίες επιτελούν σημαντικές για τον ξενιστή βιολογικές λειτουργίες. Σε μελέτες τους ο van de Lagemaat και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι τα 5' UTRs μιας μεγάλης μερίδας mRNAs περιέχουν τμήματα μεταθετών στοιχείων, που δείχνει: α. τον συμβάλλοντα ρόλο τους στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και β. ότι ένα μεγάλο μέρος των ρυθμιστικών στοιχείων των ευκαρυωτικών γονιδίων προκύπτει κατά αυτόν τον τρόπο, δηλαδή μέσω της εισαγωγής των μεταθετών στοιχείων και όχι μόνο μέσω σημειακών μεταλλάξεων των στατικών γειτονικών αλληλουχιών (137).

Παράλληλα, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν υποδείξει ότι και τα LTR ρετροτρανσποζόνια εξυπηρετούν στην γονιδιακή έκφραση ως δότες ενισχυτών και υποκινητών. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί το γονίδιο CYP19, που κωδικοποιεί για το ένζυμο-κλειδί (P450) στη βιοσύνθεση των οιστρογόνων. Στο εν λόγω γονίδιο, ένα αρχέγονο LTR δρα ως εναλλακτικός υποκινητής που εντοπίζεται 100kb ανοδικά της

κωδικεύουσας περιοχής και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφή του γονιδίου στον πλακούντα ανθρώπου και πρωτεύοντων και κατά συνέπεια στην ρύθμιση των επιπέδων οιστρογόνων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (137).

Η ύπαρξη πολλαπλών κωδικοποιών γονιδίων, που έχουν προκύψει από μεταθετά στοιχεία, στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα δεν αποτελεί ένα απρόσμενο γεγονός καθώς η ικανότητα τους να παράγουν πρωτεΐνες με δυνατότητες δέσμευσης, σχάσης, σύνδεσης και αποικοδόμησης νουκλεϊνικών οξέων όπως και επεξεργασίας και αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να είναι συμφέρουσες διαδικασίες για τα κύτταρα-ξενιστές. Γονίδια του ξενιστή έχουν προκύψει από σχεδόν όλα τα είδη τραπεζοζονιακών γονιδίων, που περιλαμβάνουν γονίδια για τραπεζοζάσες, ιντεγκράσες, αντίστροφες μεταγραφάσες, πρωτεΐνες φακέλου και Gag. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν το γονίδιο της τελομεράσης, μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που ανήκει στη οικογένεια αντίστροφων μεταγραφασών και η πρωτεΐνη Rag1, μια τραπεζοζάση, η οποία μαζί με την Rag2 αρχίζει τον μηχανισμό ανασυνδυασμού V(D)J των ανοσοσφαιρινών. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των μεταθετών στοιχείων ως πηγή νέων κυτταρικών ρυθμιστών και λειτουργιών (92).

Επιπρόσθετα, τα μεταθετά στοιχεία θεωρείται πως διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο κατά τη εξέλιξη των ειδών. Μέσω της σύγκρισης γονιδιωμάτων έχει αποδειχθεί ότι το περιεχόμενο των μεταθετών στοιχείων διαφέρει ανάμεσα στα γονιδιώματα των σπονδυλωτών. Τα θηλαστικά εμφανίζονται να συσσωρεύουν περισσότερα μεταθετά στοιχεία συγκριτικά από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά. Η ποικιλία στον αριθμό των αντιγράφων ανάμεσα στα διάφορα είδη αφορά τους τύπους και τις οικογένειες των τραπεζοζονίων, που περιλαμβάνουν στο γονιδιώμα τους και αντικατοπτρίζει τη δράση των μεταθετών στοιχείων συναρτήσει της συχνότητας εξάλειψής τους. Η ειδική ανά γενεά (*lineage-specific*) ενεργότητα και εξέλιξη των μεταθετών στοιχείων μπορεί να αποτελεί πηγή για την υφιστάμενη βιοποικιλότητα ανάμεσα στα σπονδυλωτά. Τα γεγονότα ρετρομετάθεσης και οι προκαλούμενες από ρετρομεταθέσεις γονιδιωματικές ανακατατάξεις που συσχετίζονται δυναμικά με ή γεγονότα επακόλουθα της ειδογένεσης παρατηρήθηκαν σε διάφορες γενεές σπονδυλωτών και χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τον φυλογενετικό καθορισμό τους (138). Ένα παράδειγμα αποτελούν οι 11.000

εισαγωγές των μεταθετών στοιχείων L1, Alu και SVA που διαφοροποιούν το γονιδίωμα του ανθρώπου από αυτό του χιμπατζή (139).

Συμπληρωματικά με τα ανωτέρω, η τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης, λόγω της μετάθεσης των μεταθετών στοιχείων θεωρείται υπεύθυνη για τις γενετικές διαφορές ανάμεσα στα είδη που οδηγούν στην μετάφραση διαφορετικών προτύπων έκφρασης γονιδίων για το κάθε είδος (species-specific patterns of gene expression) (39). Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του γονιδίου FMO1 (human flavin-containing mono-oxygenase 1), στο οποίο η παρουσία αλληλουχιών L1 στην περιοχή ενός εκ των τριών εναλλακτικών υποκινητών του ανθρώπινου γονιδίου FMO1 έχει αναφερθεί να ευθύνεται για τις διαφορές στην έκφρασή του, ως προς το είδος και ιστό συγκριτικά με το πρότυπο έκφρασης ανθρώπου και ποντικού (140).

Ένας άλλος πιθανός σημαντικός ρόλος προκύπτει από το γεγονός ότι τα μεταθετά στοιχεία παρουσιάζουν συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης κατά ένα ιστοειδικό τρόπο. Κάποια στοιχεία έχουν υψηλή έκφραση κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων της ζωής του ξενιστή-οργανισμού, ενώ κάποια άλλα έχουν ακόμη και διαφορετική έκφραση στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα (1). Αυτή η θεωρία ενισχύθηκε από παρατηρήσεις στα ωοκύτταρα ποντικού, όπου κάποια ρετροτρανσποζόνια μπορούν να επηρεάζουν την ρύθμιση ορισμένων γονιδίων του ξενιστή τους και να επιδρούν στις αναπτυξιακές διαδικασίες των ωοκυττάρων και προεμφυτευμένων εμβρύων (98). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η δράση των μεταθετών στοιχείων πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στην γενετική και επιγενετική ρύθμιση, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της χρωματίνης και αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος οδηγώντας σε σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση και λειτουργία (98, 141, 142). Επίσης τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να έχουν σημαντική επίδραση στις σχετικές συνεισφορές των δύο ζευγών πατρικών χρωμοσωμάτων στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Σε πολλά ζώα, κάποια γονίδια παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση σύμφωνα με τη πατρική τους προέλευση, ενώ στα θηλαστικά κάποια μεταθετά στοιχεία δρουν ως αποτυπωμένα γονίδια (*“imprinted”*) κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον τύπο τους. Για αυτό τον λόγο πιθανώς το DNA των SINEs είναι μεθυλιωμένο και άρα αδρανοποιημένο στο ωοκύτταρο, αλλά μη μεθυλιωμένο στα αρσενικά γαμετικά κύτταρα (9). Αντιθέτως, τα ενδοκυστικά στοιχεία IAP και τα LINE-1,

έχουν αντίθετο προφίλ (143). Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι μητρικά και πατρικά αποτυπωμένα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα τείνουν να καταλαμβάνουν διακριτές γονιδιακές περιοχές που ενεργοποιούνται διαφορετικά στις γαμετικές σειρές αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Επίσης, τα περισσότερα γεγονότα ρετρομετάθεσης των L1 στο γονιδίωμα του ανθρώπου και του ποντικού εμφανίζονται κατά την εμβρυογένεση, ενώ μόνο ένα μικρό μέρος των γεγονότων αυτών προσβάλλουν την γαμετική σειρά και είναι κληρονομήσιμα. Τα ευρήματα αυτά, έπειτα από πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα προτείνουν ότι η πλειοψηφία των L1 ρετρομεταθέσεων στον άνθρωπο εμφανίζονται κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της εμβρυογένεσης (62).

Ακόμη, σε μια εργασία του Εργαστηρίου μας, έχει αποδειχθεί η μεταγραφική ενεργότητα των ρετροτρανσποζονίων L1, HERV-K10 και SVA σε ανθρώπινα ωοκύτταρα, προτείνοντας ότι η ύπαρξη ενός δικτύου ρετροτρανσποζονιακών μεταγράφων και ρυθμιζόμενων ρετρομεταθέσεων μπορεί να προσφέρει απαραίτητες σημαντικές λειτουργίες κατά την ανάπτυξη και γονιμοποίηση ωαρίων, ενώ η ανεξέλεγκτη πραγματοποίηση ρετρομεταθέσεων μπορεί να εξηγεί την έναρξη γενετικών ασθενειών (144). Αυτά τα ευρήματα περιγράφουν/αποκαλύπτουν τον ρόλο των μεταθετών στοιχείων στην αναδιοργάνωση της δομής του γονιδιώματος, την αποσιώπηση γονιδίων κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυονικής ανάπτυξης καθώς και την ύπαρξη κάποιου μηχανισμού κυτταρικής ρύθμισης των. Πράγματι, διάφορες μελέτες προτείνουν ότι τα μεταθετά στοιχεία διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη δομή του γονιδιώματος, στην δομή των χρωμοσωμάτων και συγκεκριμένα στα κεντρομερή και τελομερή, στη γονιδιακή αναδόμηση και γονιδιακή έκφραση (3, 5, 16).

Επιπρόσθετα των επιπτώσεών τους κατά την εμβρυονική ανάπτυξη, τα μεταθετά στοιχεία μπορεί να δρουν αργότερα στη ζωή του οργανισμού. Πράγματι, στον ποντικό τα ρετροτρανσποζόνια LINE-1 δίνουν την εντύπωση ότι μετατίθενται κατά προτίμηση σε ρυθμιστικές περιοχές κάποιων νευρωνικών γονιδίων (145). Αυτό αλλάζει την γονιδιακή έκφραση παράγοντας διακριτούς πληθυσμούς νευρωνικών κυττάρων (σωματικός μωσαικισμός). Οι ακριβείς επιδράσεις τέτοιων δραστηριοτήτων από τα μεταθετά στοιχεία δεν έχουν εξακριβωθεί ακόμη αλλά αν εμφανίζονται και στους ανθρώπους, η δράση των στοιχείων LINE-1 μπορεί να ευθύνεται για αλλαγές στα νευρωνικά κυκλώματα στον εγκέφαλο, συνεισφέροντας στην εγκεφαλική/πνευματική

ετερογένεια ανάμεσα στους ανθρώπους. Αυτή η δυνατότητα ανοίγει νέους ερευνητικούς δρόμους, προηγουμένως αδιανόητους στο ότι τα μεταθετά στοιχεία υποκινούν τη γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα SINEs εμπλέκονται ως ενισχυτές της γονιδιακής έκφρασης του αναπτυσσόμενου προσθεγκεφάλου του ποντικού προτείνοντας ότι τόσο τα LINEs όσο και τα SINEs ενδέχεται να διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους στην ανάπτυξη του νευρωνικού δικτύου των θηλαστικών.

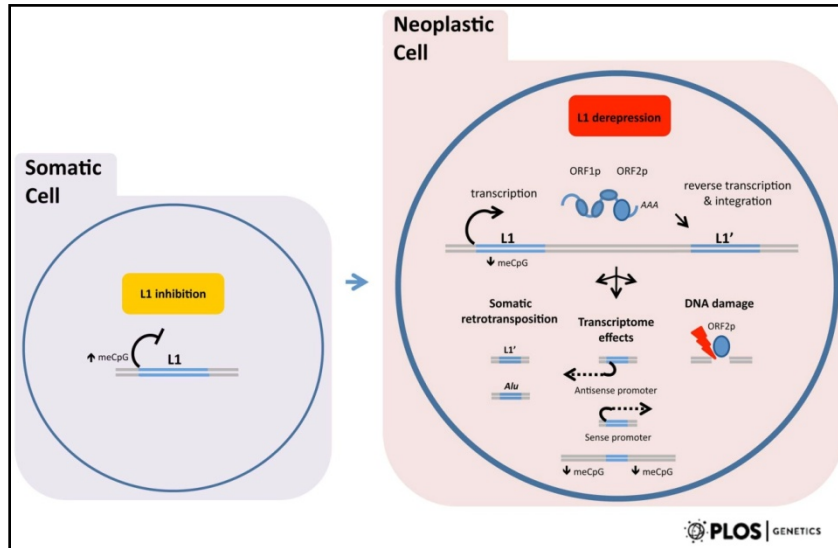
Συνοπτικά, τα ρετρομεταθετά στοιχεία μπορούν να συμβάλλουν στην γενετική ποικιλομορφία, αναδόμηση γονιδιώματος, επαγωγή γονιδιακής έκφρασης με την εισαγωγή ρυθμιστικών αλληλουχιών όπως σινιάλα πολυαδενυλίωσης, κωδικοποιά εξώνια, πλήρη RNA γονίδια και ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, στην ειδογένεση και σε αναπτυξιακές διαδικασίες εμφανίζοντας συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης κατά την ανάπτυξη και γονιμοποίηση ωαρίων, Αλλά επίσης μπορούν να ωθούν μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, με πιθανή πρόκληση κάποιας ασθένειας.

1.8 Κυτταρικοί μηχανισμοί προστασίας από τα γεγονότα ρετρομετάθεσης

Φυσιολογικά, η συχνότητα ρετρομετάθεσης σε ένα κύτταρο είναι πολύ μικρή. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα, πιθανώς για να περιορίσουν τις επιβλαβείς γενωμικές επιπτώσεις των γεγονότων ρετρομετάθεσης ανέπτυξαν διάφορους μηχανισμούς άμυνας που επηρεάζουν διάφορα στάδια της διαδικασίας ρετρομετάθεσης (76). Ο περισσότερο τεκμηριωμένος μηχανισμός αφορά την μεθυλίωση του DNA στους υποκινητές των ρετροτρανσποζονίων, μέσω της οποίας παρεμποδίζεται άμεσα η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων ή τοπικά οδηγεί σε ανενεργή μορφή χρωματίνης (146).

Κατά κύριο λόγο, η μεθυλίωση στον υποκινητή του ρετροτρανσποζονίου, επιβάλλει τη μεταγραφική καταστολή του (85, 147, 148). Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα έχουν συσχετιστεί με την υπομεθυλίωση του 5' άκρου των ρετροτρανσποζονίων L1 και την έκφραση των L1 πρωτεϊνών και έχει προταθεί ένας ενεργός ρόλος της υπομεθυλίωσης στην ενεργοποίηση των ρετροτρανσποζονίων σε ανθρώπινους καρκίνους (Εικόνα 1.11). Υπομεθυλίωση στον υποκινητή του L1 έχει αναφερθεί στο πολλαπλό μυέλωμα (149), στη χρόνια μυελοειδής λευχαιμία (CML) (150) και την χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία προτείνοντας ότι τα L1 μπορεί να μεταγράφονται σε αυτούς

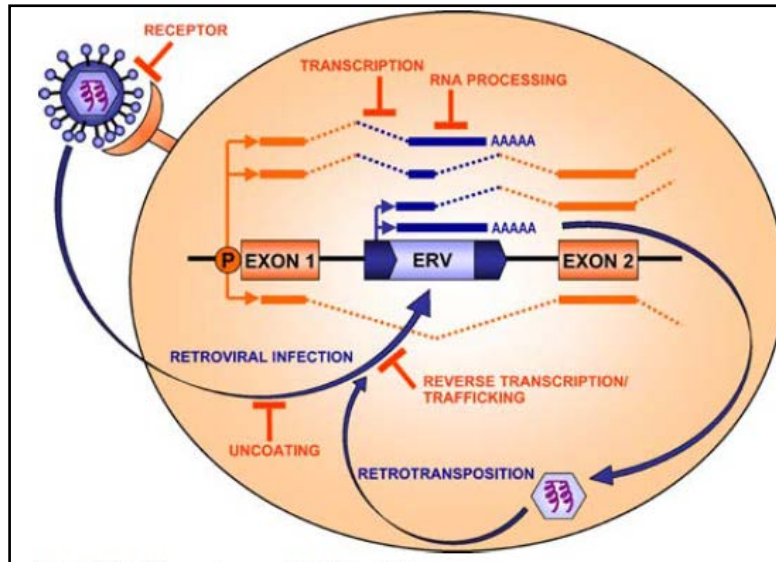
τους καρκίνους (151). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περιπτώσεις CML με υπομεθυλιωμένο τον υποκινητή των L1, τείνουν να είναι επιθετικά νεοπλάσματα με φτωχή πρόγνωση παρόλο που δεν είναι γνωστή η άμεση σύνδεση των L1 με την επιθετικότητα (aggressiveness) (150).



Εικόνα 1.11: Η DNA μεθυλίωση και συναφείς μηχανισμοί εμποδίζουν την έκφραση των L1, ενώ η υπομεθυλίωση του DNA επιτρέπει την ρετρομετάθεσή των. Στα φυσιολογικά somatic κύτταρα, η DNA μεθυλίωση και συναφείς μηχανισμοί εμποδίζουν την έκφραση των L1 (αριστερή εικόνα). Στα νεοπλασματικά κύτταρα, η υπομεθυλίωση του DNA επιτρέπει την ρετρομετάθεση των L1 (δεξιά εικόνα). Απεικονίζεται η ρετρομετάθεση του στοιχείου L1, συναρμολόγηση των πρωτεϊνών ORF1p και ORF2p μαζί με το L1 RNA και η νέα ενσωμάτωση του L1 σε μια νέα θέση (L1'). Συναφείς επιπτώσεις στους όγκους δείχνονται εννοιολογικά όπως (i) somatic ρετρομεταθέσεις των L1 και μη αυτόνομων επαναλαμβανόμενων στοιχείων, όπως τα στοιχεία Alu, (ii) μεταγραφικές αλλαγές, που επάγονται από τους υποκινητές του L1 (πρόσθιου-sense και ανάστροφου-antisense) ή έχουν αντίκτυπο στην μεθυλίωση και (iii) η πρωτεΐνη ORF2p προκαλεί θραύσεις στο DNA

Πολλαπλοί επιγενετικοί τροποποιητές συμμετέχουν στην αποσιώπηση των ρετροτρανσποζονίου όπως είναι η DNA μεθυλοτρανσφεράση Dnmt3L, η οποία είναι κρίσιμη για την μεθυλίωση ρετροτρανσποζονίων σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (primordial germ cells) (152, 153). Ακόμη, αρκετά αποδεικτικά στοιχεία επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση μεταξύ γενωμικής υπομεθυλίωσης και ενεργοποίησης των LTR ρετροτρανσποζονίων. Μελέτες σε ποντίκια με μεταλλαγμένη την DNA μεθυλοτρανσφεράση *Dnmt1* (*Dnmt1*^{-/-}) παρατηρήθηκε απομεθυλίωση στα

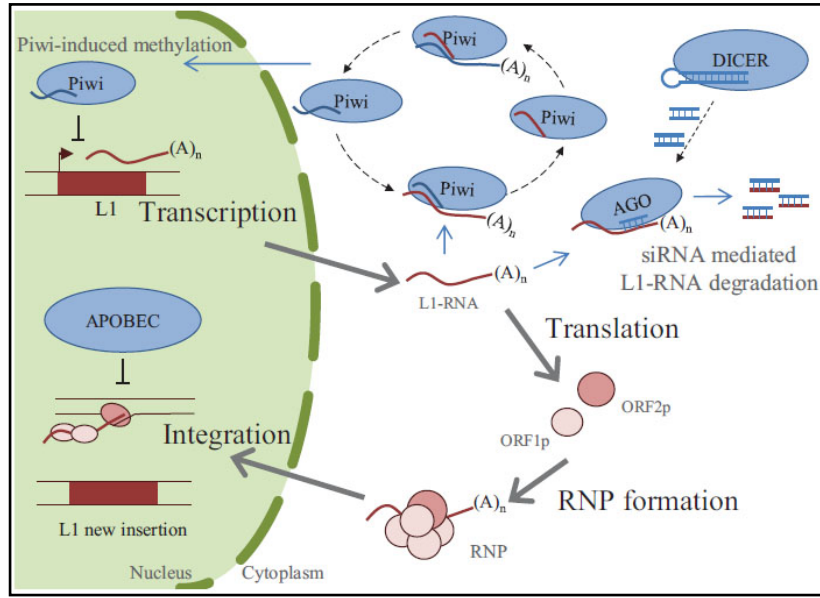
ρετροτρανσποζόνια MoMLVs και IAPs (154), ενώ η έκφραση των IAPs αυξήθηκε 100 φορές εν συγκρίσει με τα αγρίου τύπου ποντίκια (155). Η μεθυλοτρανσφεράση Dnmt1 είναι απαραίτητη μετά την αντιγραφή του DNA, ενώ οι μεθυλοτρανσφεράσες Dnmt3a και Dnmt3b είναι αναγκαίες στη γαμετική σειρά και κατά την ανάπτυξη για τη δημιουργία ενός προτύπου μεθυλίωσης (156). Μετά από πειράματα σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ES) με αποσιωπημένες τις πρωτεΐνες Dnmt3a και Dnmt3b (knockout), παρατηρήθηκε ανικανότητα μεθυλίωσης των νέων ενθέσεων MoMLV. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η ενδογενής μεθυλίωση μειώνει την απόδοση της RNA πολυμεράσης II (157), γεγονός που προτείνει ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης των ρετροτρανσποζονίων μπορεί να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση.



Εικόνα 1.12: Απεικονίζονται οι μηχανισμοί αποσιώπησης των ρετροϊών ή των ρετροτρανσποζονίων LTR σε ποικίλα στάδια του κύκλου ζωής τους. Μερικά παραδείγματα περιοριστικών γονιδίων και μηχανισμών αποσιώπησης αποτελούν: μπλοκάρισμα μεμβρανικών υποδοχέων, παρεμπόδιση δράσης αντίστροφης μεταγραφάσης και μηχανισμών επεξεργασίας RNA (RNA processing block), μεθυλίωση νησίδων CpG και μεταγραφική παρεμπόδιση, μηχανισμός παρεμπόδισης RNAi και η δράση των πρωτεϊνών APOBEC. Η εισαγωγή ενός LTR ρετροτρανσποζονίου σε ένα ιντρόνιο οδηγεί σε διακοπή έκφρασης γονιδίων μέσω εισαγωγής σημάτων πολυαδενυλίωσης, υποκινητών και θέσεων ματίσματος. Τα ματισμένα RNA απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές καθώς επίσης και η μεταγραφή ενός γονιδίου, υπό φυσιολογικές συνθήκες από τον υποκινητή P. Ακόμη, τα πλήρους μεγέθους μετάγραφα του ρετροτρανσποζονίου πακετάρονται για να εκτελέσουν νέους κύκλους ρετρομετάθεσης ή ρετροϊικής μόλυνσης. Τέλος, είναι πιθανή η παραγωγή ποικίλων μεταλλαγμένων ή χειμερινών μεταγράφων.

Επιπρόσθετα, ο μηχανισμός παρεμπόδισης RNAi (RNA interference), εμπλέκεται στη μετα-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων του επαναλαμβανόμενου DNA. Στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του ποντικού ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα LTR ρετροτρανσποζονιακών μεταγράφων των IAP και ERV-L, σε αντίθεση με τη μη ανιχνεύσιμη έκφρασή τους μετά το στάδιο των 8 κυττάρων (98, 158). Η αποσιώπηση της ενδοριβονουκλεάσης Dicer (knock-out) σε κύτταρα ES ποντικού, οδήγησε στην αύξηση της μεταγραφής των μεταθετών στοιχείων L1s και IAPs, σε συνδιασμό με την πρόκληση διάφορων αναπτυξιακών επιπτώσεων (159). Ακόμη, μικρά RNA παρεμπόδισης (siRNAs) μπορούν να ενεργοποιούν τη τοπική ετεροχρωματίνη (160) ενώ μετα-μεταφραστικές ιστονικές τροποποιήσεις εμπλέκονται επίσης στην αποσιώπηση τρανσποζονίων. Πράγματι, οι κατασταλτικές ιστονικές τροποποιήσεις H3K9me3 και H4K20me3 συσχετίζονται με τους ενδογενείς ρετροϊούς (ERVs) σε κύτταρα ES ποντικού (161, 162). Εξάλλου, η αποσιώπηση (knock out) μιας μεθυλοτρασφεράσης ιστόνης (SETDB1) ή της πρωτεΐνης πρόσληψής της (recruit) (KAP-1)(163) σε ES κύτταρα ποντικού προκαλεί μείωση της H3K9me3 στους ERVs και επάγει υψηλή έκφραση διάφορων οικογενειών ERVs όπως και γονιδίων που ρυθμίζονται από υποκινητές που εντοπίζονται στους ERVs (164).

Η καταστολή της ρετρομετάθεσης μπορεί επίσης να ενισχυθεί από μικρά RNAs (small RNAs) σε γαμετικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού αποσιώπησης που μεσολαβείται από τα Piwi-interacting RNAs (76) (Εικόνα 1.13). Τα Piwi-interacting RNAs μαζί με άλλα μικρά RNAs, συμπεριλαμβανομένου των siRNAs και micro-RNAs, δρουν στην αποικοδόμηση των μεταγράφων του ρετροτρανσποζονίου μέσω του μηχανισμού παρεμπόδισης RNA (RNA interference, RNAi) (52, 165-168). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός RNAi, είναι ένας υψηλά συντηρημένος μηχανισμός άμυνας ενάντια στα ρετροτρανσποζόνια, κυρίως στα γαμετικά κύτταρα (52, 169-171). Σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (LNCaP) έχει βρεθεί δραματική μείωση (>9-fold) των PIWI-L1 εν συγκρίσει με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα προστάτη με ταυτόχρονη δράση της ORF2p πρωτεΐνης, γεγονός που υποστηρίζει το ρόλο των PIWI στην αποσιώπηση ρετρομετάθεσης των L1 (50).



Εικόνα 1.13: Η ρετρομετάθεση και τα μονοπάτια αποσιώπηση των L1s. Η μετάθεση των L1s απαιτεί τα βασικά βήματα της μεταγραφής, έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα, μετάφραση, σχηματισμό ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου, είσοδο στον πυρήνα και τελικά ενσωμάτωση στο DNA. Το επαγόμενο από τα Piwi μονοπάτι αποσιώπησης μέσω μεθυλίωσης περιλαμβάνει ένα κύκλο ενίσχυσης που τροφοδοτείται από την αποικοδόμηση των αντιγράφων L1s από τα Piwi. Το μονοπάτι αποικοδόμησης RNA (μηχανισμός RNA interference) ρυθμίζεται από την παραγωγή siRNAs από δίκλινα μόρια RNAs (dsRNAs) από την νουκλεάση Dicer και την αποικοδόμηση των L1 RNAs από την οικογένεια πρωτεϊνών AGO. Η ενσωμάτωση των L1s παρεμποδίζεται επίσης από διάφορους παράγοντες του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου της οικογένειας APOBEC3. Πρωτεΐνες και RNAs που εμπλέκονται στα μονοπάτια αποσιώπησης L1 απεικονίζονται με μπλε χρώμα και τα L1RNAs και οι πρωτεΐνες τους με ροζ χρώμα.

Η επιγενετική και μετα-μεταφραστική καταστολή της ρετρομετάθεσης συμπληρώνεται με παράγοντες του ξενιστή που εμποδίζουν την παραγωγή νέων ενσωματώσεων. Ποικίλα προϊόντα γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου κάποιων γονιδίων προερχόμενων από ιούς (domesticated viral genes) δρουν σε διάφορα στάδια του ρετροϊκού κύκλου ζωής ώστε να περιορίσουν τόσο τους εξωγενείς όσο και τους ενδογενείς ρετροϊούς (ERVs) (172-174). Παραδείγματα αποτελούν η πρωτεΐνη APOBEC3G η οποία καταστέλλει την ρετρομετάθεση των IAP και MusD/ETn (175) και η πρωτεΐνη Nxf1(176). Πολυάριθμες μελέτες αναφέρονται στον περιορισμό της ρετρομετάθεσης των L1s σε καλλιεργούμενα κύτταρα από μέλη της οικογένειας απαμινασών APOBEC3 (A3). Αξιοσημείωτες είναι δύο πρόσφατες μελέτες που

υποστηρίζουν ότι οι απαμινάσες APOBEC3 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση μεταλλαγών κατά την ογκογένεση (pan-cancer APOBEC3 mutagenesis signature) (177, 178). Η δράση των πρωτεϊνών APOBEC3 ενδέχεται να προστατεύει τα κύτταρα από τα δυνητικά ογκογενετικά γεγονότα ρετρομετάθεσης.

Ένας άλλος παράγοντας που έχει αποδειχθεί να περιορίζει τη ρετρομετάθεση των L1 σε καλλιιεργούμενα κύτταρα, είναι η ελικάση RNA, MOV10. Η MOV10 συνδέεται με τον παράγοντα AGO2 του συμπλόκου αποσιώπησης RNA και το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο L1 και μπορεί με αυτόν τον τρόπο να αποικοδομήσει ή να παρεμποδίσει την μετάφραση του mRNA του L1 (179). Οι παραπάνω μηχανισμοί αυτοί αποτελούν κάποιους μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου ξενιστή έναντι της ρετρομετάθεσης. Ως εκ τούτου, η απουσία ή η μείωση κάποιων μηχανισμών άμυνας μετά την γονιμοποίηση, όπως των Piwi-interacting RNAs (180) μπορεί να επιτείνει δυσανάλογα την ρετρομετάθεση στα σωματικά κυττάρια, μια άποψη που υποστηρίζεται από λιγότερες εμφανίσεις ρετρομεταθέσεων στους γαμέτες εν συγκρίσει με τα σωματικά κύτταρα (61, 62, 181).

1.9 Η Επιθηλιακή-Μεσεγχοματική Μετάπτωση (EMT) & Καρκίνος

Η καρκινογένεση αποτελεί μια σταδιακή συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών (182). Διάφοροι τύποι προκαρκινικών αλλοιώσεων επάγονται από γενετικές αλλαγές, οι οποίες προσδίδουν ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης των κυττάρων και επιτρέπουν την μονοκλωνική ή πολυκλωνική επέκτασή τους. Η περαιτέρω συσσώρευση γενετικών αλλαγών σε πρωτοογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια επιδιόρθωσης DNA, μπορεί να οδηγήσει τα προκαρκινικά κύτταρα σε κακοήθη προκαλώντας την έναρξη του σχηματισμού πρωτογενών όγκων (183). Το κρίσιμο σημείο στην κακοήθεια είναι η μεταστατική διασπορά των πρωτογενών καρκινικών κυττάρων, τα οποία αρχικά ήταν ανίκανα να διηθήσουν τους γύρω ιστούς (183, 184). Κατά την διάρκεια της ασθένειας η μάζα του όγκου παρουσιάζει μια ετερογένεια, καθώς τα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν επιπλέον μεταλλάξεις και αλληλεπιδρούν με το τοπικό τους μικροπεριβάλλον (185). Ως αποτέλεσμα, ένας μικρός αριθμός κυττάρων θα ξεπεράσει τους θεμελιώδεις κανόνες της φυσιολογικής κυτταρικής συμπεριφοράς, θα αποκολληθεί από τα γειτονικά κύτταρα, θα διηθήσει τοπικά το γύρω

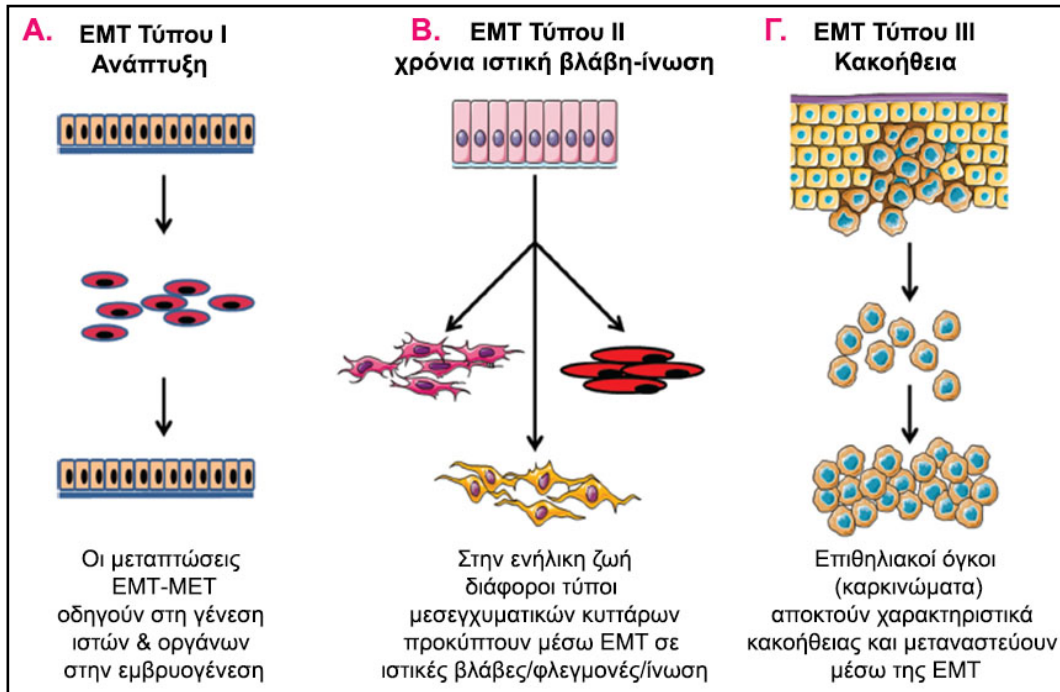
ιστό και τελικά θα προσχωρήσει στην κυκλοφορία του αίματος ή στα λεμφικά αγγεία, θα μεταναστεύσει και θα προσκολληθεί σε απομακρυσμένες θέσεις στο σώμα προκαλώντας μεταστάσεις (183). Το πρώτο και κύριο βήμα της διαδικασίας αυτής είναι η τοπική διήθηση μέσω της επιθηλιακής βασικής μεμβράνης, καθώς απαιτούνται τροποποιήσεις των κύτταρο προς κύτταρο και κύτταρο προς μήτρα αλληλεπιδράσεων, όπως αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας (μήτρα) και κυτταροσκελετού και ενίσχυση της κυτταρικής κινητικότητας. Προς αυτή την κατεύθυνση, υποστηρίζεται ότι ειδικά γεγονότα επάγουν την απώλεια της επιθηλιακής και απόκτησης μεσεγχυματικής μορφολογίας ενός μικρού αριθμού κυττάρων μέσω της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT) (183).

Η EMT είναι μια πολυσταδιακή φαινοτυπική μετάπτωση, κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα υπόκεινται σε μοριακές αλλαγές που οδηγούν σε απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων, αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και απώλεια της πολικότητας των κυττάρων (186, 187). Ως αποτέλεσμα των αλλαγών αυτών, τα κύτταρα διαμορφώνουν τον επιθηλιακό φαινότυπο τους αποκτώντας ιδιότητες μεσεγγύματος και ενισχύουν την κινητικότητα των. Τα διαμορφωμένα μεσεγχυματικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα επιθηλιακά, έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύουν ως μονήρη κύτταρα και να διαπερνούν τους γύρω ιστούς (186, 187).

Είναι πλέον σαφές ότι η EMT συμβαίνει σε τρεις διαφορετικές βιολογικές καταστάσεις (188, 189). Ενώ το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή κινητικών κυττάρων με μεσεγχυματικό φαινότυπο, οι μηχανισμοί επαγωγής της EMT και η εξέλιξή της διαφέρουν δραματικά μεταξύ των τριών τύπων EMT. Η EMT τύπου I συσχετίζεται με την εμφύτευση, εμβρυογένεση, και ανάπτυξη των οργάνων (Εικόνα 1.14 Α). Κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, το μεσόδερμα που παράγεται από EMT αναπτύσσεται σε πολλούς τύπους ιστών και αργά κατά τη ανάπτυξη, τα κύτταρα του μεσοδέρματος παράγουν επιθηλιακά όργανα όπως νεφρούς, ωοθήκες, μέσω της αντίστροφης μεσεγχυματικής-επιθηλιακής μετάπτωσης MET (190), με σκοπό την ορθή μορφογένεση και δημιουργία ενός λειτουργικού οργανισμού.

Μελέτες αναπτυξιακής γενετικής αποκάλυψαν ένα αριθμό πλειοτροπικά λειτουργικών μεταγραφικών παραγόντων που διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους κατά την εμβρυογένεση ενορχηστρώνοντας τη διαδικασία EMT (191). Πρόσφατες δε μελέτες

αποκάλυψαν ότι αυτοί οι εμβρυονικοί μεταγραφικοί παράγοντες οδηγούν σε παθολογικές συνέπειες όταν εκφράζονται κατά τη ενήλικη ζωή (192, 193) και συνοδεύονται με κακοήθη χαρακτηριστικά όπως κινητικότητα, ικανότητα διήθησης και ανθεκτικότητα στην απόπτωση νεοπλασματικών κυττάρων (191, 194).



Εικόνα 1.14: Τύποι EMT.

Κατά την ενήλικη ζωή, η EMT διευκολύνει την μορφογένεση των οργάνων όπως και την αναγέννηση και ανάπλαση των ιστών κατά την επούλωση τραύματος (188). Εντούτοις, υποστηρίζεται ότι η EMT συμβάλλει στην διήθηση και στην ανάπτυξη των μεταστατικών όγκων. Η EMT τύπου II σχετίζεται με την ιστική αποκατάσταση και την ίνωση (Εικόνα 1.14B) (189). Σε περιπτώσεις ιστικής βλάβης ή φλεγμονής συμβαίνει επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάπτωση και ενεργοποίηση ινοβλαστών, η οποία οδηγεί σε επούλωση. Συνήθως με την ολοκλήρωση της επούλωσης, η διαδικασία της EMT διακόπτεται. Εάν η διαδικασία της EMT δεν διακοπεί τότε προκαλείται ίνωση με τελική συνέπεια την καταστροφή του ιστού (195, 196).

Η EMT τύπου III συνδέεται με την καρκινογένεση (Εικόνα 1.14 Γ) (188, 189) και εμφανίζεται σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, τα οποία διαφέρουν γενετικά και επιγενετικά από τα μη-μετασχηματισμένα κύτταρα. Αυτές οι αλλαγές κυρίως επηρεάζουν

ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια προκαλώντας αποτελέσματα πολύ διαφορετικά από εκείνα που παρατηρούνται στους άλλους δυο τύπους EMT (186, 187, 191). Τα κύτταρα που προέρχονται από την EMT τύπου III μπορούν να προσβάλλουν κάποιο όργανο αλλά και να μεταφερθούν σε άλλα όργανα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος οδηγώντας σε απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Η προοδευτική εξέλιξη από φυσιολογικό επιθήλιο σε διηθητικό καρκίνωμα περιλαμβάνει διάφορα στάδια. Το διηθητικό στάδιο του καρκίνου χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και αποκόπτονται από την βασική μεμβράνη. Ταυτόχρονα αλλάζει η σύσταση της βασικής μεμβράνης, επηρεάζοντας τα σηματοδοτικά δίκτυα και τις δια-αντιδράσεις μεταξύ κυττάρων και θεμέλιας ουσίας. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την μετάπτωση EMT και την αγγειογενετική μετατροπή, που χαρακτηρίζει την κακοήθη φάση της ανάπτυξης του όγκου. Η σταδιακή εξέλιξη από αυτό το στάδιο, σε μεταστατικό καρκίνωμα, περιλαμβάνει πάλι την EMT που διευκολύνει τα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να εξέλθουν σε κάποια απομακρυσμένη θέση, δημιουργώντας μικρο- ή μακρο-μεταστάσεις (188). Όταν τα μεταφερόμενα με την κυκλοφορία μεταστατικά καρκινικά κύτταρα, που προκύπτουν από την τύπου III EMT, εγκατασταθούν σε άλλους ιστούς ενίοτε υπόκεινται και στην αντίθετη διαδικασία την MET και σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους με επιθηλιακό φαινότυπο (186, 197).

Αν και γνωρίζουμε αρκετά για τα βήματα που σχετίζονται με την EMT τύπου I και II, δεν είναι ακόμα γνωστό ποιοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί προκαλούν την τύπου III EMT στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Εντούτοις, έχουν καθοριστεί διάφορα διασυνδεδεμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ένας αριθμός σηματοδοτικών μορίων που εμπλέκονται δυναμικά στην EMT (187). Σε αυτά περιλαμβάνονται αναπτυξιακοί παράγοντες (TGF- β , FGF, EGF), υποδοχείς τυροσινικών κινασών (TGF β -R, FGF-R, EGF-R), Ras και άλλες μικρές GTPάσες, Src, το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης και ιντεγκρίνες (191, 198). Ακόμη, ως επαγωγείς της EMT έχουν χαρακτηριστεί οι μεταγραφικοί καταστολείς του μορίου της E-καντερίνης όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες Snail1 (Snail) και Snail2 (Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 και E47 (199). Η EMT μπορεί να επάγεται σε επιθηλιακά κύτταρα έπειτα από έκθεση σε διάφορες κυτταροκίνες, όπως ο TGF- β 1 ή από εξωγενή έκφραση ποικίλων

μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου της οικογένειας των Twist ή Snail (200-202). Ενεργοποίηση της διαδικασίας αυτής σε καρκινικά κύτταρα μαστού αυξάνει το διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό τους.

1.9.1. E-καντερίνη και EMT

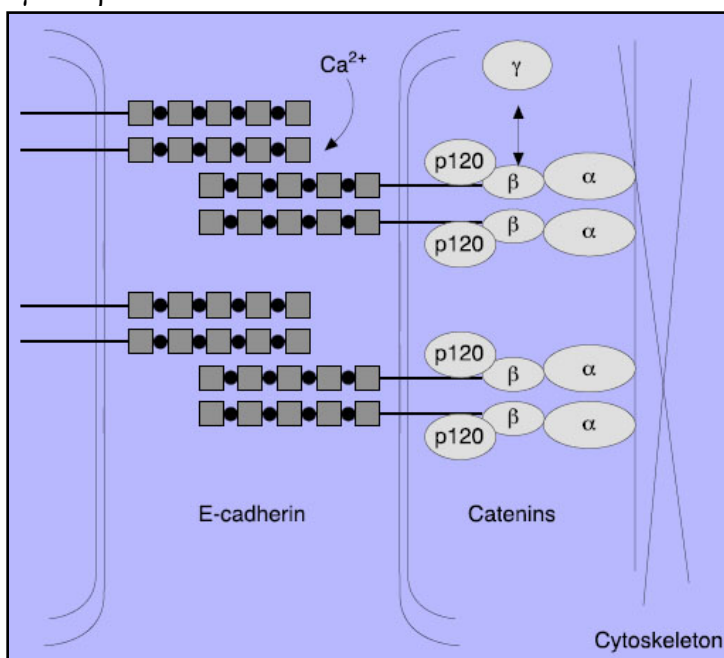
Ένα από τα βασικά μοριακά χαρακτηριστικά της EMT στην καρκινογένεση είναι η λειτουργική απώλεια του κατεξοχήν επιθηλιακού μορίου της E-καντερίνης (E-cadherin), μια πρωτεΐνη η οποία επί του παρόντος θεωρείται αναστολέας της διήθησης κατά την ανάπτυξη καρκινωμάτων (199). Σε φυσιολογικούς ιστούς η E-καντερίνη εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία είναι τα προγονικά κύτταρα των καρκινωμάτων (the progenitors of carcinomas). Τα καρκινώματα αποτελούν πάνω από το 70% των ανθρώπινων όγκων παγκοσμίως και το 80% των σχετιζόμενων από καρκίνους θανάτων στις ΗΠΑ (SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975–2010 on the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program website).

Η E-καντερίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *Cdh1*, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 (16q22.1) και θεωρείται ένας σημαντικός ρυθμιστής κατά την μορφογένεση (203). Η απώλεια της E-καντερίνης αποτελεί ένα κρίσιμο γεγονός για την μετάσταση ενός όγκου, ως κύριου προγραμματιστή της EMT (*'master' programmer of EMT*) (204, 205) και οδηγεί σε απώλεια έκφρασης λειτουργικής πρωτεΐνης ή/και μεταγραφικής καταστολής του mRNA της.

Οι E-καντερίνες αποτελούν ασβέστιο-εξαρτώμενες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των οποίων οι ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις συνδέουν γειτονικά κύτταρα σχηματίζοντας προσκολλητικές συνδέσεις (206). Οι προσκολλητικές αυτές συνδέσεις εξυπηρετούν στην διατήρηση του φυσιολογικού φαινότυπου των επιθηλιακών κυττάρων και είναι υπεύθυνες για την ισχυρή κύτταρο-προς-κύτταρο προσκόλληση η οποία προσδίδει πολικότητα στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και τα αποτρέπει από την απομακρυσμένη μετανάστευσή τους. Στην κυτταρική μεμβράνη, οι καντερίνες απαντώνται ως ετεροδιμερή συνδεδεμένα με τον κυτταροσκελετό (ακτίνη) μέσω ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που περιλαμβάνει την α -, β - και p120-κατενίνη (207) (Εικόνα 1.15) .

Η απώλεια της E-καντερίνης χρησιμοποιείται για τη διάγνωση και πρόγνωση των επιθηλιακών καρκίνων. Στην καρκινογένεση, η μειωμένη έκφραση της E-καντερίνης

αποτελεί μια από τις αλλαγές που χαρακτηρίζουν τον διηθητικό φαινότυπο, δεδομένα που υποστηρίζουν τον ρόλο της σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο (208). Μελέτες αποδεικνύουν ότι αλλαγές στην έκφραση της συνδέονται με την απόκτηση ικανότητας διήθησης και ενός πιο προχωρημένου σταδίου του όγκου σε πολλούς καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου μαστού, πνεύμονα, προστάτη και παχέος εντέρου (208). Συγκεκριμένα, το γονίδιο της E-καντερίνης (*Cdh1*) είναι κατασταλαμένο σε πολλούς διάχυτους τύπους καρκίνου (*diffuse-type cancers*), όπως για παράδειγμα το λοβιακό καρκίνωμα μαστού και καρκινώματος στομάχου διαχύτου τύπου όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα σε ολόκληρο τον όγκο έχουν χάσει τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους και παρουσιάζονται ιδιαίτερα διηθητικά κατά ένα παραγόμενο από την EMT ιστολογικό πρότυπο.



Εικόνα 1.15: Διαγραμματική αναπαράσταση των ομοφιλικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των E-καντερινών και ομοτυπικών κυτταρικών προσκολλήσεων στο επιθήλιο. Διμερή E-καντερίνης συνδέουν γειτονικά κύτταρα διευκολύνοντας την επιθηλιακή ακεραιότητα.

Η μειορρύθμιση της E-καντερίνης έχει επίσης παρατηρηθεί και σε συμπαγείς μη διάχυτους τύπους καρκίνου στα όρια στρώματος-όγκου, όπου διηθητικά παραγόμενα από EMT καρκινικά κύτταρα έχουν βρεθεί σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Σε αυτό το τελευταίο σενάριο, η απώλεια της E-καντερίνης και η επαγωγή της EMT μπορούν να είναι παροδικές, αντιστρεπτές διαδικασίες πιθανά ρυθμιζόμενες από το μικροπεριβάλλον

του όγκου και στην πραγματικότητα, νεοπλασματικά κύτταρα που υποβάλλονται σε EMT κατά τη διάρκεια της διήθησης δείχνουν να επανακτούν την έκφραση της E-καντερίνης και των επιθηλιακών συνεκτικών χαρακτηριστικών τους σε δευτερογενείς εστίες (*secondary foci*) μέσω της αντίστροφης διαδικασίας MET (205). Η μειορύθμιση της E-καντερίνης ευνοεί την διασπορά των καρκινικών κυττάρων, αλλά η επανάκτηση της έκφρασή της ευνοεί την επιβίωση και επαναπροσκόλλησή των μετά από μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές (209).

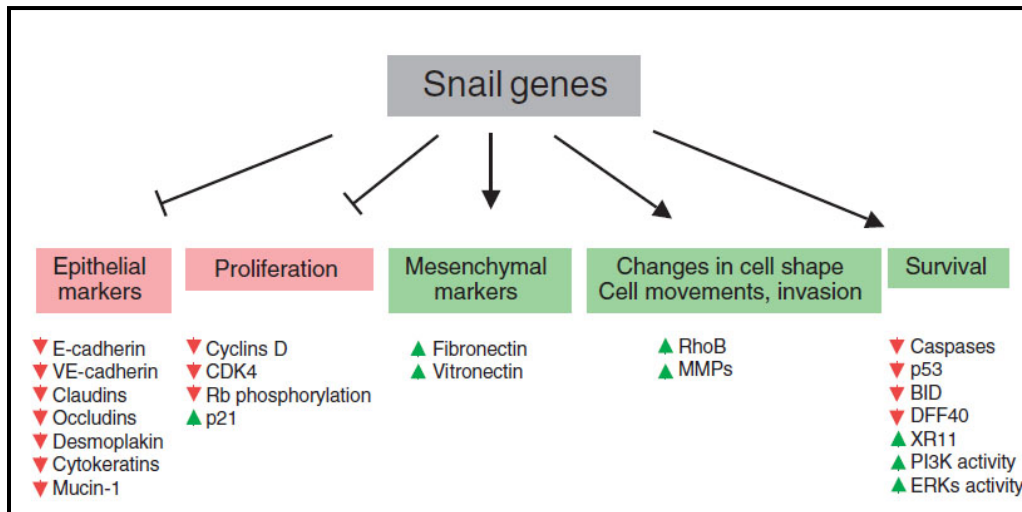
Αν και αλλαγές στην έκφραση της E-καντερίνης μπορούν να προκύψουν μέσω διάφορων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της απώλειας ετεροζυγωτίας και αδρανοποίησης μέσω μεταλλάξεων, η E-καντερίνη συχνά αποσιωπάται επιγενετικά μέσω μη φυσιολογικής υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της (*CDH1*) (210). Ενδιαφέρον, αποτελεί το γεγονός ότι όταν η E-καντερίνη αποσιωπάται μέσω υπερμεθυλίωσης στον υποκινητή, οι επιθηλιακές σειρές κυττάρων μαστού συχνά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά μορφολογίας μεσεγγύματος μέσω συντονισμένης επαγωγής ενός συνόλου γονιδίων που εμπλέκονται στην EMT (μονοπάτι TGF-β, μεταγραφικοί παράγοντες Snail1, Snail2, Twist, annexin, μορίων οργάνωσης κυτταροσκελετού ακτίνης και ενδιάμεσων ινιδίων) (211). Αντιθέτως, όταν η E-καντερίνη αδρανοποιείται μέσω μεταλλάξεων, τα κύτταρα διατηρούν την επιθηλιακή μορφολογία τους και αυτά τα γονίδια δεν επάγονται (211). Τα ανωτέρω προτείνουν ότι μια σειρά μοριακών αλλαγών που οδηγούν σε EMT, διήθηση και μετάσταση μπορούν να τροποποιηθούν επιγενετικά (212). Εντούτοις, πιστεύεται ότι τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να μειορυθμίζουν την δράση του συμπλέγματος E-καντερίνης/κατενίνης ώστε να καθίστανται ικανά να διηθούνται στους γύρω ιστούς (εικόνα 4) (213).

Τέλος, στο επίπεδο της μεταγραφικής ρύθμισης έχουν χαρακτηριστεί διάφοροι καταστολείς της E-καντερίνης οι οποίοι μειορυθμίζουν την έκφραση της αλληλεπιδρώντας με τα ειδικά E-boxes, που φέρει στον υποκινητή της (214). Σημαντικό δε γεγονός αποτελεί το ότι οι πλείστοι, αν όχι όλοι, οι καταστολείς της E-καντερίνης είναι γνωστοί ως επαγωγείς της EMT και παίζουν ρυθμιστικό ρόλο κατά την ανάπτυξη (*EMT-inducing developmental regulators*). Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την αντίστροφη μετάπτωση MET φαίνεται να είναι ανάλογοι με αυτούς που

δραστηριοποιούνται στην EMT, με επανέκφραση της E-καντερίνης και μειορύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την EMT (215).

1.9.2. Μεταγραφικοί παράγοντες Snail, Slug, Twist και TGF- β & EMT

Κρίσιμο σημείο στην επαγωγή από EMT διαδραματίζουν τα γονίδια της οικογένειας Snail, καθώς η έκφρασή τους έχει δειχθεί να ενεργοποιείται σε όλα τα σχετιζόμενα με την EMT σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν μέχρι στιγμής προσδιοριστεί (200). Αυτά εμπλέκονται στην απώλεια επιθηλιακών δεικτών, απόκτηση μεσεγχυματικών δεικτών και συνεπώς στην επαγωγή μορφολογικών αλλαγών στα κύτταρα και απόκτησης ιδιοτήτων κινητικότητας και διήθησης (198, 216) (Εικόνα 1.16). Συγκεκριμένα, οι μεταγραφικοί παράγοντες Snail και Slug έχουν περιγραφεί ως άμεσοι καταστολείς της E-καντερίνης (216-219) *in vitro* και *in vivo* μέσω αλληλεπιδράσεων του καρβοξυτελικού τους άκρου με την αλληλουχία 5'-CACCTG-3' (E box) (220) του υποκινητή της E-καντερίνης. Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν ότι τα γονίδια Snail ρυθμίζουν τις κυτταρικές προσκολλήσεις και την μετανάστευση (219). Σε αυτό το πλαίσιο, η επαγωγή EMT μπορεί να αποτελεί απλά ένα από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες, ώστε να επιτρέπεται η κυτταρική κινητικότητα (219).



Εικόνα 1.16: Η έκφραση των γονιδίων Snail επάγει την απώλεια των επιθηλιακών δεικτών και απόκτηση μεσεγχυματικών δεικτών, όπως και η επαγωγή μορφολογικών αλλαγών στα κύτταρα καθώς και η απόκτηση ιδιοτήτων κινητικότητας και διήθησης. Τα γονίδια Snail ρυθμίζουν επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο

Τα γονίδια Snail έχουν επιπρόσθετες κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες κάποιες φορές εμφανίζονται ανεξάρτητα από την επαγωγή της μετάπτωσης EMT. Προστατεύουν τα κύτταρα από τον θάνατο, που επάγεται είτε από την απώλεια παραγόντων επιβίωσης ή από άμεσα αποπτωτικά σήματα. Για τους εν λόγω μεταγραφικούς παράγοντες έχει προταθεί πως εμπλέκονται στην απόκτηση ανθεκτικότητας στην απόπτωση και συνεπώς προάγουν την επιβίωση του όγκου (218). Έχει αποδειχθεί ότι σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού, η έκφραση του Snail1 συσχετίζεται με την αποδιαφοροποίηση και την μετάσταση (221-223) και η έκφραση του Snail2 (Slug) με την καταστολή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *BRCA2* (224)

Ένας ακόμη δυναμικός επαγωγέας της EMT θεωρείται η κυτοκίνη TGF-β1, η οποία προσδίδει διηθητικές και μεταναστευτικές ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα καθώς επίσης έχει συνδεθεί και με την απόκτηση χαρακτηριστικών βλαστικών κυττάρων (225). Η επαγόμενη από τον TGF-β1 EMT, μεσολαβείται από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι οι πρωτεΐνες Snail, Zeb και Twist οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Smad και με τη σειρά τους σχηματίζουν σύμπλοκα που δεσμεύουν και καταστέλλουν υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν επιθηλιακές πρωτεΐνες (συνδετικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που προσδίδουν πολικότητα και κυτοκερατίνες) (226). Πράγματι, οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3, που δρουν καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού από τον TGF-β, σχηματίζουν σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα Snail και δρουν κατασταλτικά στον υποκινητή του γονιδίου της E-καντερίνης (*Cdh1*) (227). Επίσης με την επαγωγή του TGF-β1 ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες β-κατενίνη, Ap1 και Sp1, οι οποίοι επίσης σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Smad και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση μεσεγχυματικών γονιδίων όπως είναι η N-καντερίνη και η βιμεντίνη (225, 226).

Ένα άλλο μόριο που έχει ενοχοποιηθεί για την εμπλοκή του στην EMT είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Twist. Η πρωτεΐνη Twist εμπλέκεται στην εμβρυογένεση, την EMT και την κυτταρική μετανάστευση και μπορεί να σχηματίζει ομο- και ετεροδιμερή και τροποποιήσεις στην αμινοξική αλληλουχία της, ικανές να προκαλέσουν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες και τη δέσμευση στο DNA (228, 229). Υπερέκφραση του Twist παρατηρήθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού, προστάτη, πνεύμονα, μήτρας, ήπαρ και έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου και τον χαμηλό

βαθμό επιβίωσης ασθενών καρκίνου μαστού (229-231). Θεωρείται κρίσιμος επαγωγέας της EMT, μειορρυθμίζοντας την E-καντερίνη και επιτρέποντας την απόκτηση μεσεγχυματικού φαινοτύπου, διήθηση και μετάσταση (228).

Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας Twist συμμετέχει στην αγγειογένεση και στην επαγωγή φαινοτύπου βλαστικών κυττάρων (232-234). Συγκεκριμένα η υπερέκφρασή του σε κύτταρα μαστού οδηγεί στην μειορύθμιση του CD24 και αύξηση της έκφρασης του CD44, δηλαδή στον αντιγονικό φαινότυπο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μαστού (CD44^{high}/CD24^{low}) (232, 234). Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι η καταστολή του Twist σε μεταστατικά κύτταρα μαστού εμποδίζει την διαδικασία μετάστασης προς τον πνεύμονα, ενώ η μη φυσιολογική υπερ-έκφρασή του προωθεί την παρεμπόδιση της έκφρασης της E-καντερίνης οδηγώντας στην απώλεια των κύτταρο-προς-κύτταρο (διακυτταρικών) προσκολλησεων, ενεργοποίηση μεσεγχυματικών δεικτών και κυτταρική κινητικότητα (228, 235, 236). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σε πειράματα σε κύτταρα μαστού με αποσιωπημένη την E-καντερίνη και με αυξημένη έκφραση του Twist, παρατηρήθηκε ότι έπειτα από εκτοπική έκφραση της E-καντερίνης δεν επανακτάται ο επιθηλιακός φαινότυπος των κυττάρων (228). Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Twist επάγει την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών κατά την EMT, ανεξάρτητα από την έκφραση της E-καντερίνης (228).

Μεταγραφικός παράγοντας	Μειορύθμιση έκφρασης κατά την EMT	Αύξηση έκφρασης κατά την EMT	Ρυθμιστικά σηματοδοτικά μονοπάτια
Snail και Slug	E-cadherin, claudins, occludin, Crumbs3, PALS1, PATJ, cytokeratins, desmoplakin, plakophilin	Fibronectin, N-cadherin, collagen, MMP15, MMP2, MMP9, TWIST, ID1, ID2, ZEB1, ZEB2	TGFβ-SMAD3, WNT-β-catenin, Notch, PI3K-AKT, NF-κB, EGF, FGF
Twist1	E-cadherin, claudins, occludin, desmoplakin, plakoglobin	Fibronectin, N-cadherin, α5 integrin	MAPK

Πίνακας 1.1: Μεταγραφικοί παράγοντες-επαγωγείς EMT, οι στόχοι τους και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν της δράση τους (191).

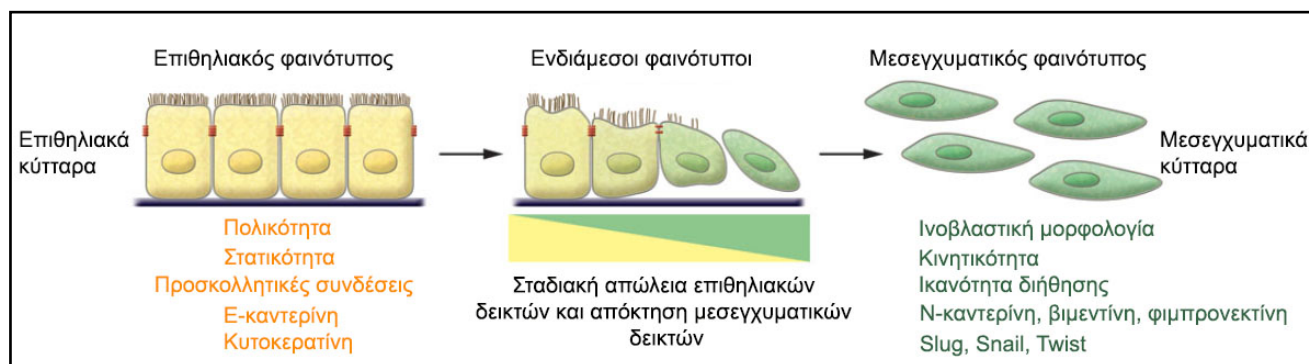
1.9.3. Επαγόμενοι δείκτες μεσεγχύματος κατά την EMT

Σε πολλούς καρκίνους η απώλεια της E-καντερίνης (*'cadherin switch'*) κατά την EMT, συνοδεύεται από την έκφραση της N-καντερίνης. Η N-καντερίνη είναι μια πρωτεΐνη προσκόλλησης, τυπικά εκφράζεται σε μεσεγχυματικά και ενδοθηλιακά κύτταρα, ενισχύει την κινητικότητα και μετανάστευση καρκινικών κυττάρων και ασκεί κύριο ρόλο, πέραν της E-καντερίνης, στη μετάπτωση EMT. Η απώλεια της E-καντερίνης και απόκτηση της N-καντερίνης έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι είναι υπεύθυνη και για την ενισχυμένη κινητικότητα των κυττάρων που προκύπτει κατά τη φυσιολογική EMT στην εμβρυογένεση (209). Συγκεκριμένα, η N-καντερίνη έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του υποδοχέα FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1). Ομοδιμερή της N-καντερίνης (*cis dimmers*) δεσμεύονται στον υποδοχέα FGFR1 εμποδίζοντας τη σύνδεσή του με τον συνδέτη του και κατά αυτόν τον τρόπο διατηρούν την σηματοδότηση στην κυτταρική μεμβράνη συμβάλλοντας στην κακοήθεια (237, 238). Επιπλέον, η N-καντερίνη διευκολύνει την διήθηση και μετάσταση προάγοντας τη συγγένεια των καρκινικών κυττάρων ως προς τα κύτταρα στρώματος και ενδοθηλιακά κύτταρα (209). Η επαγωγή της N-καντερίνης σε αρχικά επιθηλιακά κύτταρα διευκολύνει την ετεροτυπική σύνδεσή τους με άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι τα κύτταρα του στρώματος και τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά τη N-καντερίνη. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να συμβάλλει στην τοπική διήθηση και μεταστατική διασπορά των καρκινικών κυττάρων (238).

Άλλοι μοριακοί δείκτες επαγωγής EMT πέραν από την έκφραση της N-καντερίνης αποτελεί η αυξημένη έκφραση φιβρονεκτίνης (*fibronectin*), βιμεντίνης (*vimentin*), ο εντοπισμός της β-κατενίνης στον πυρήνα καθώς και η αυξημένη έκφραση διάφορων μεταγραφικών παραγόντων, όπως προαναφέρθηκε (*Snail, Slug, Twist, E47, E2F1/ZEB1, SIP1/ZEB2 και E47*), που παρεμποδίζουν την έκφραση της E-καντερίνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι φαινοτυπικοί δείκτες της EMT περιλαμβάνουν αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης τρισδιάστατης διήθησης (*three-dimensional invasion*) και ανθεκτικότητα στην απόπτωση σε συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης (*anoikis*) (239).

Ακόμη, πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ένα υβριδικό τύπο κυττάρων, που εμφανίζει τόσο επιθηλιακά χαρακτηριστικά (διατήρηση επιθηλιακού φαινοτύπου και E-καντερίνης) όσο και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά (έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών

πχ α -SMA) και ονομάστηκαν μεταστάσιμα κύτταρα (*metastable cells*) (Εικόνα 1.17). Συνέκφραση χαρακτηριστικών και των δύο κυτταρικών τύπων στο ίδιο κύτταρο αναφέρθηκε από τον Brabletz και βασίζεται στην παρουσία ιδιοτήτων βλαστικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα εντέρου μετά από επαγωγή EMT (240), προτείνοντας την ύπαρξη αυτού του φαινομένου και στα προγονικά κύτταρα διάφορων οργάνων. Η συμπεριφορά τέτοιων ενδιάμεσων κυττάρων παρέχει μια πρώτη ένδειξη ότι τα επιθηλιακά κύτταρα υπό τις στρεσογόνες συνθήκες φλεγμονής μπορούν να προχωρήσουν σε διάφορους βαθμούς μετάπτωσης EMT, εισάγοντας την έννοια της μερικής EMT (“partial EMT”) (188). Τελικά αυτά τα κύτταρα θα εγκαταλείψουν το επιθηλιακό στρώμα, θα διαπεράσουν την βασική μεμβράνη και θα συσσωρευτούν στο ενδιάμεσο του ιστού όπου στο τέλος θα απωλέσουν όλους τους επιθηλιακούς τους δείκτες και θα αποκτήσουν ένα πλήρως μεσεγχυματικό φαινότυπο (188).



Εικόνα 1.17: Κατά την EMT τα επιθηλιακά κύτταρα υπόκεινται σε μειορύθμιση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών τους και μεταπίπτουν σε μεσεγχυματικά κύτταρα, εκφράζοντας δείκτες μεσεγγύματος. Απεικονίζονται μερικά από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των δύο κυτταρικών φαινοτύπων. Η συνέκφραση επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών ορίζει την ύπαρξη ενός ενδιάμεσου φαινοτύπου EMT, υποδεικνύοντας κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί μερική EMT.

1.10 Μαστικός αδένας και βλαστικά κύτταρα

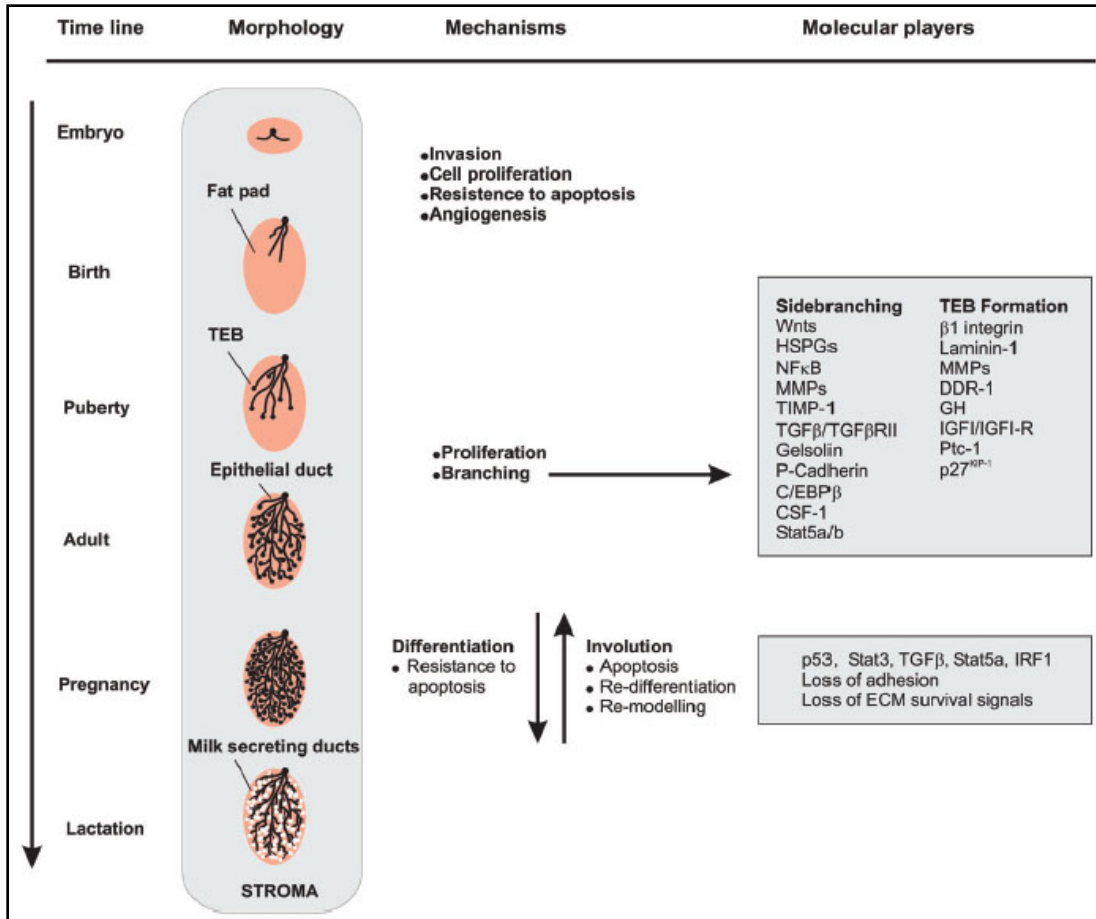
Ο μαστικός αδένας στα θηλαστικά είναι ένα δυναμικό όργανο το οποίο υπόκειται σε σημαντικές αναπτυξιακές αλλαγές κατά την εγκυμοσύνη, γαλακτοποίηση και απογαλακτοποίηση (241). Το επιθήλιο του μαστού αποτελείται από ένα διακλαδιζόμενο δίκτυο (network of ducts) που εισβάλλει στον λιπώδη ιστό, το οποίο σχηματίζεται πριν την γέννηση (242). Το δίκτυο σχηματίζεται από ένα βασικό στρώμα

μυοεπιθηλιακών κυττάρων και από ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων του αυλού. Κατά την εφηβεία το διακλαδιζόμενο δίκτυο αυξάνει υπό την επίδραση των ορμονών οδηγώντας σε περαιτέρω διακλαδώσεις. Το τελικό στάδιο διαφοροποίησης επιτυγχάνεται στον μαστικό αδένα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλακτοποίησης, με την τελική διαφοροποίηση και τη παραγωγή των κυψελιδωτών κυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκκριση γάλακτος. Τέλος, ο απογαλακτισμός συνοδεύεται από μαζική απόπτωση των κυττάρων και αναδιαμόρφωση του ιστού με τελική επαναφορά του αδένα στο στάδιο πριν την εγκυμοσύνη.

Με την πάροδο του χρόνου έχουν διαλευκανθεί διάφορα μονοπάτια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και απόπτωση, τα οποία περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις στρώματος-επιθηλίου και εξαρτώνται από ορμόνες, τοπικούς αναπτυξιακούς παράγοντες, αλληλεπιδράσεις κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία και διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων (243). Για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η ύπαρξη μιας ομάδας κυττάρων με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό για την τέλεση πολλών εγκυμοσύνων, μια περιγραφή που ταιριάζει με τον καθορισμό βλαστικών ή πρώιμων προγονικών κυττάρων.

Πρόσφατα έχει προσδιοριστεί η ύπαρξη βλαστικών και προγονικών κυττάρων στον μαστικό αδένα ποντικού και ανθρώπου, γεγονός που έφερε νέα στοιχεία για την οργάνωση του μαστικού επιθηλίου κατά ένα ιεραρχικό τρόπο (241, 244). Τα βλαστικά και προγονικά κύτταρα διακρίνονται από τα υπόλοιπα κύτταρα, βάσει δύο χαρακτηριστικών (245): (1) μπορούν να αυτό-ανανεώνονται μέσω ασυμμετρικής διαίρεσης (Asymmetric Cell Division, ACD), δηλαδή να αναπαραγάγουν αντίγραφα του εαυτού τους και (2) είναι πολυδύναμα κύτταρα (pluripotent), ή ικανά να διαφοροποιούνται σε ώριμους κυτταρικούς τύπους. Τα προκύπτοντα από την ασυμμετρική διαίρεση βλαστικά και προγονικά κύτταρα διατηρούν την ικανότητα αυτό-ανανέωσής τους και το δυναμικό διαφοροποίησής, δημιουργώντας μια δεξαμενή βλαστικών/προγονικών κυττάρων του ιστού. Αυτά τα κύτταρα θεωρείται πως εξυπηρετούν τρεις βασικές λειτουργίες (244): (α) οδηγούν στην ιστογένεση του ενήλικα μαστικού αδένα κατά την ανάπτυξη, (β) επιτρέπουν την επέκταση του ιστού και την αναδιαμόρφωση που παρατηρείται στο μαστικό αδένα κατά την εγκυμοσύνη,

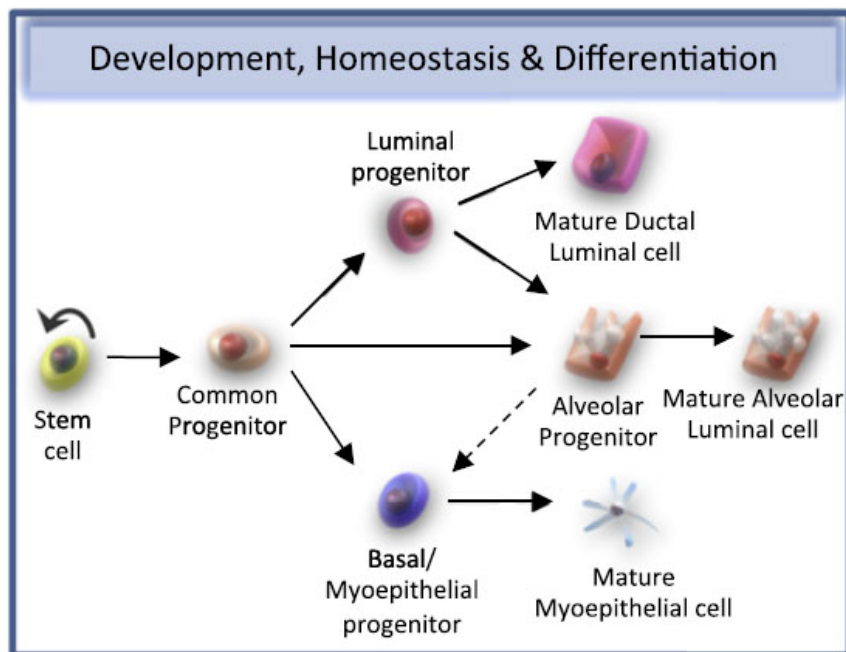
γαλακτοποίηση και απογαλακτοποίηση και (γ) εξυπηρετούν στην αποκατάσταση και επιδιόρθωση ιστικών βλαβών.



Εικόνα 1.18: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων στρώματος-επιθηλίου κατά την ανάπτυξη του μαστικού αδένα. Η εκβλάστηση του μαστικού αδένα εμφανίζεται κατά την εμβρυογένεση και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται μετά την γέννηση. Οι ορμόνες κατά την εφηβεία οδηγούν στην ανάπτυξη του επιθηλιακού δικτύου και τελικών εκβλαστήσεων (TEB), που εισβάλλουν στον λιπώδη ιστό. Οι ορμόνες της εγκυμοσύνης επάγουν την πλήρη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό του μαστικού αδένα, σχηματισμό κυψελιδωτών κυττάρων και έκκριση γάλακτος. Ο απογαλακτισμός συνοδεύεται από μαζική απόπτωση των κυττάρων και αναδιαμόρφωση του ιστού με τελική επαναφορά του αδένα στο στάδιο πριν την εγκυμοσύνη.

Την δεκαετία του 50 ο DeOme και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν την ύπαρξη ενήλικων βλαστικών κυττάρων στον μαστικό αδένα, των οποίων οι απόγονοι, ως προγονικά κύτταρα κλώνων ήταν ικανά να οδηγήσουν στην δημιουργία ολόκληρων, λειτουργικών αποφύσεων (outgrowths) του μαστικού αδένα μετά από μεταμόσχευση τους σε ποντίκια (244). Στην συνέχεια άλλοι ερευνητές απέδειξαν ότι δείγματα από

οποιοδήποτε μέρος του μαστικού αδένος ήταν ικανά να δημιουργήσουν επιθηλιακές αποφύσεις μαστού σε ποντίκια ανεξάρτητα από την ηλικία και το αναπτυξιακό τους στάδιο (246).



Εικόνα 1.19: Το κλασικό μοντέλο διαφοροποίησης του μαστού (Visvader, 2009). Ένα κοινό προγονικό κύτταρο διατηρεί δύο ειδικούς προγόνους (lineage-specific progenitors) αυτών των κυττάρων του αυλού και βασικών/μυοεπιθηλιακών κυττάρων, καθώς και των προγόνων των κυψελιδωτών κυττάρων. Έχει προταθεί επίσης ότι τα προγονικά κύτταρα των κυψελιδωτών κυττάρων είναι διδύναμα (bipotent) κατά την εγκυμοσύνη (διακεκομμένο βέλος).

Έχει προταθεί ότι τα κύτταρα που σχηματίζουν το επιθηλιακό τμήμα του μαστικού αδένος προέρχονται από μαστικά βλαστικά κύτταρα (mammary stem cells, MSCs), τα οποία θεωρούνται σημαντικά τόσο για την ανάπτυξη όσο και την διατήρηση της ομοιότητας του ιστού (241). Τα MSCs έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται αναπαράγοντας τον εαυτό τους και να διαφοροποιούνται δίνοντας γένεση σε επιθηλιακά προγονικά κύτταρα (epithelial precursor cells, EPCs) οι απόγονοι των οποίων εκτελούν ιστοειδικές λειτουργίες (241, 243). Συγκεκριμένα οι απόγονοι των EPCs διαφοροποιούνται στα επιθηλιακά κύτταρα του πόρου (ductal) και στα κυψελιδωτά κύτταρα (alveolar). Από τα προγονικά κύτταρα του πόρου (ductal precursor cells, DPs) προκύπτουν τα μυοεπιθηλιακά/βασικά κύτταρα και τα κύτταρα του αυλού (luminal cells), οι δύο κυτταρικοί τύποι που απαντώνται στους πόρους του αδένος. Κατά την

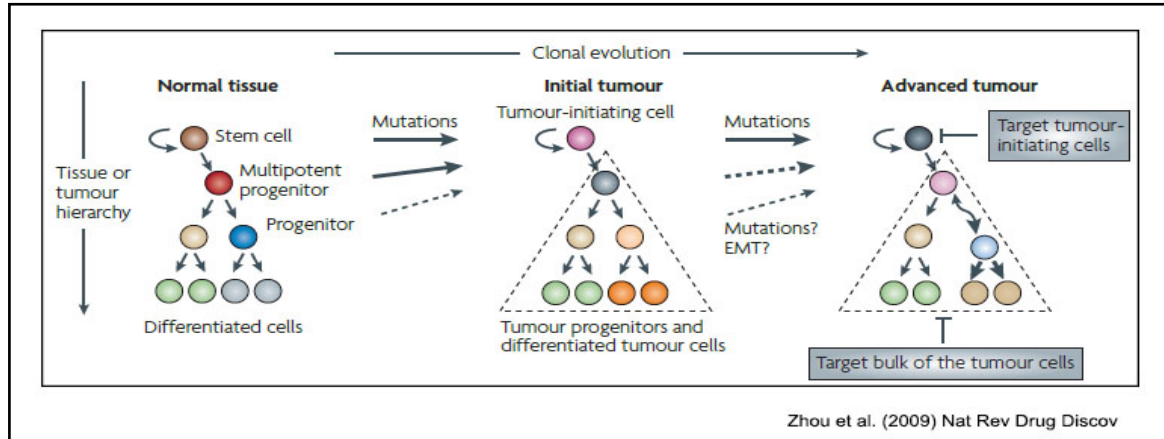
εγκυμοσύνη τα προγονικά κυψελιδωτά κύτταρα (alveolar precursors, APs) διαφοροποιούνται σε βασικά/μυοεπιθηλιακά κύτταρα και σε κυψελιδωτά κύτταρα αυλού από τα οποία παράγεται το γάλα.

1.11 Καρκινικά βλαστικά κύτταρα ή κύτταρα έναρξης όγκου και ογκογένεση

Για πολλά χρόνια πιστευόταν ότι οι όγκοι προέκυπταν από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων-κλώνων, έπειτα από συσσώρευση πολλαπλών γενετικών μεταλλάξεων με την πάροδο του χρόνου (247, 248). Σύμφωνα με αυτό το μη-ιεραρχικό μοντέλο προτείνεται ότι όλα τα κύτταρα που απαρτίζουν έναν όγκο έχουν τις ίδιες πιθανότητες να αποκτήσουν τις απαραίτητες γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν στην ανάπτυξη του όγκου. Εντούτοις, ανεξάρτητα από τη θεωρία αυτή, έχει προσδιοριστεί ότι οι καρκινικοί όγκοι αποτελούν ετερογενείς οντότητες, όπου συγκεκριμένα μόνο ένας μικρός υποπληθυσμός των καρκινικών κυττάρων είναι ικανός να αναπτύσσεται σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα (249), προτείνοντας ένα ιεραρχικού τύπου μοντέλο. Μια πιθανή εξήγηση που έχει προταθεί για το φαινόμενο αυτό είναι η θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες σε νεοπλασματικούς ιστούς έδωσαν στοιχεία για κύτταρα με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων (*stem-like cells*) μέσα σε όγκους, τα οποία ονομάστηκαν καρκινικά βλαστικά κύτταρα (*cancer stem cells, CSCs*) (81). Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν μια μικρή μερίδα των νεοπλασματικών κυττάρων ενός όγκου και προσδιορίζονται λειτουργικά από την δυνατότητά τους να αναπαραγάγουν νέους όγκους. Για τον λόγο αυτό αναφέρονται επίσης και ως κύτταρα έναρξης όγκου (*tumor-initiating cells*) (81, 249).

Στους φυσιολογικούς ιστούς, το ετερογενές πρότυπο των κυττάρων αντιστοιχεί σε ένα ιεραρχικό πρόγραμμα διαφοροποίησης, όπου οι διάφοροι ώριμοι κυτταρικοί τύποι προέρχονται από ένα κοινό πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο, μέσω ενδιάμεσων προγονικών κυττάρων (Εικόνα 1.20). Στο επίπεδο της καρκινογένεσης, οι ετερογενείς πληθυσμοί καρκινικών κυττάρων σε ποικίλα στάδια της διαφοροποίησης θα μπορούσαν να προκύπτουν τόσο από επίκτητες μεταλλάξεις όσο και από μη φυσιολογικά αλλά κατά ένα ιεραρχικού τύπου προγράμματα διαφοροποίησης. Λόγω της γενετικής αστάθειας, τα απομονωμένα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (*CSCs or tumor-initiating cells*) ενός όγκου, κατά πάσα πιθανότητα θα έχουν διαφορετικό γενετικό προφίλ από τα αρχικά

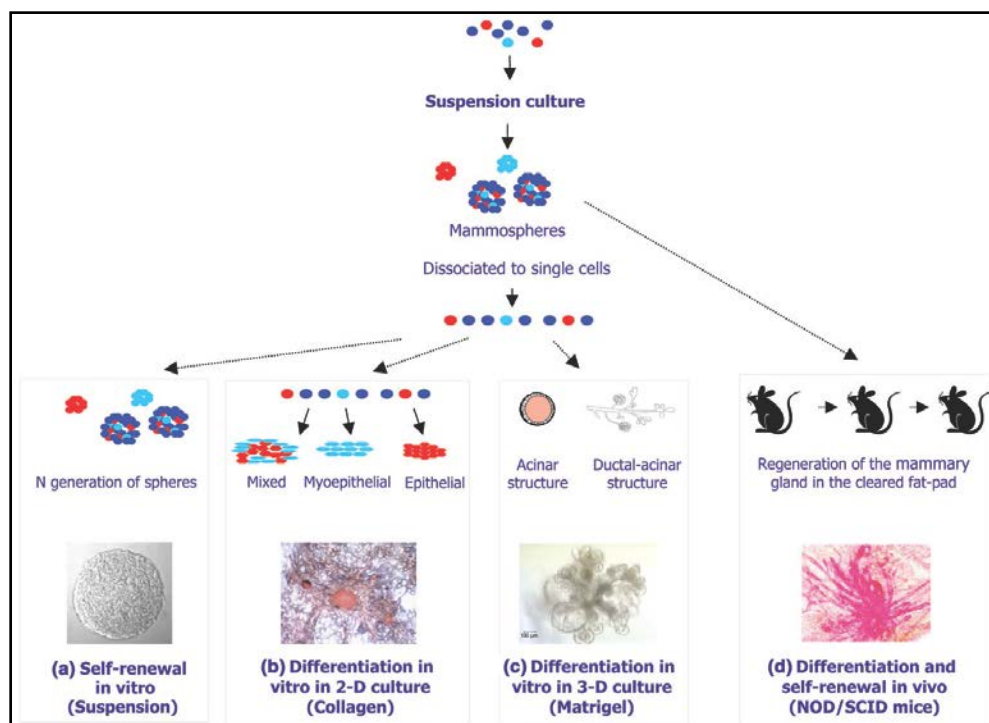
μετασηματισμένα κύτταρα από τα οποία προήλθε ο όγκος. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι καθώς οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται προκαλούν συχνά μεταλλάξεις, αναμένεται η ύπαρξη διακριτών διαφορών ανάμεσα στα CSCs όγκων που εμφανίζονται μετά από υποτροπή της ασθένειας, συγκριτικά αυτών του αρχικού όγκου (248).



Εικόνα 1.20: Ιεραρχικό μοντέλο κυττάρων φυσιολογικών ιστών και όγκων και η εξέλιξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs or tumor-initiating cells), κατά την ογκογένεση.

Πρόσφατες ανακαλύψεις σχετικά με την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των βλαστικών κυττάρων, τη κατανόηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην αυτό-ανανέωση και επιβίωση καθώς και του δυναμικού ρόλου τους σε ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στη μελέτη της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων (244). Παράδειγμα αποτελεί η παρουσία ενός μικρού υποπληθυσμού καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε ανθρώπινους όγκους μαστού, τα οποία παρουσιάζουν τον αντιγονικό φαινότυπο $CD44^{high}/CD24^{low}$. Αυτά τα κύτταρα είναι: εμπλουτισμένα σε κύτταρα έναρξης όγκου (tumor-initiating cells), συγκριτικά με την πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων φαινότυπου $CD44^{low}/CD24^{high}$ στους ίδιους όγκους και επιπλέον έχουν την δυνατότητα να προκαλούν καρκινογένεση μετά από ένεσή τους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια NOD/SCID (250). Ακόμη έχουν την ικανότητα να παράγουν επιπλέον σφαιρικά κυτταρικά συσσωματώματα ή μαμμόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης (234, 251, 252). Οι μαμμόσφαιρες έχουν χαρακτηριστεί ως αδιαφοροποίητα βλαστικά/προγονικά κύτταρα,

αφού κατέχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης στους τρεις ιστοειδικούς τύπους του μαστικού αδένου (κύτταρα αυλού, μυοεπιθηλιακά και κυψελιδωτά κύτταρα) (251, 253) (Εικόνα 1.21). Τα κύτταρα των μαμμοσφαιρών πέραν του φαινοτύπου $CD44^{high}/CD24^{low}$ εκφράζουν και τον χαρακτηριστικό δείκτη των βλαστικών κυττάρων, Oct4 (251).



Εικόνα 1.21: Τα κύτταρα μαμμοσφαιρών κατέχουν τα κατεξοχήν χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων: ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης. (a) Η αυτοανανέωση εξετάζεται από την ικανότητα των προερχόμενων από μαμμόσφαιρες κυττάρων να ανανεώνονται. (b) Κύτταρα μαμμοσφαιρών διαφοροποιούνται στους τρεις τύπους κυττάρων του μαστού, δηλαδή στα κύτταρα αυλού-επιθηλιακά κύτταρα πόρων (ductal cells), στα μυοεπιθηλιακά και κυψελιδωτά κύτταρα. (c) Σχηματίζουν σύνθετες δομές μαστικού αδένου (ductal-alveolar structures) υπό συνθήκες τρισδιάστατων καλλιέργειών (καλλιέργεια σε matrigel). (d) Η διαφοροποίηση και αυτοανανέωση μπορεί να εξεταστεί in vivo μετά από ένεση των κυττάρων σε λιπώδη ιστό ανοσοκατασταλμένων ποντικών (NOD/SCID).

Βασιζόμενοι στις ομοιότητες μεταξύ των κυττάρων-έναρξης όγκου και βλαστικών κυττάρων, οι ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στη διευκρίνιση του ερωτήματος κατά πόσο τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα δύναται να προκύψουν από βλαστικά κύτταρα, προγονικά κύτταρα ή διαφοροποιημένα κύτταρα ενός ενήλικου ιστού

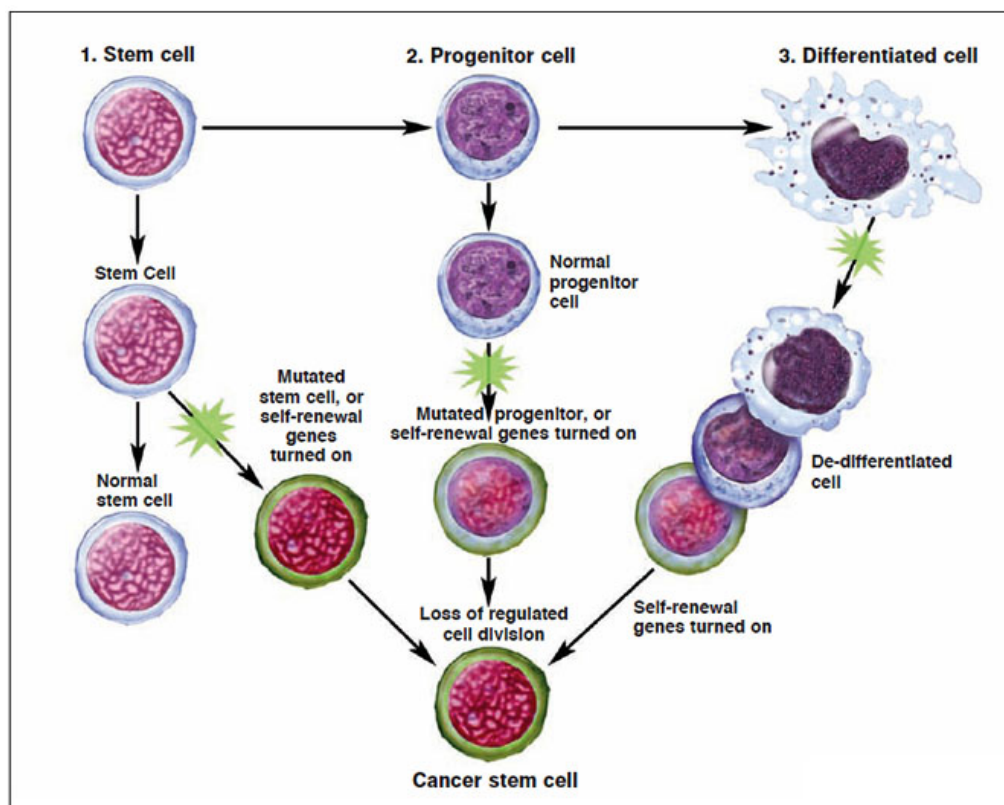
(248). Σύμφωνα με την πρώτη πιθανή υπόθεση ένα καρκινικό κύτταρο μπορεί να προκύψει από τα ενυπάρχοντα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα ενός ιστού (Εικόνα 1.22). Τα κύρια επιχειρήματα που υποστηρίζουν ότι τα βλαστικά κύτταρα των ιστών μπορούν να είναι οι βασικοί στόχοι μετασχηματισμού, συνοψίζονται ως εξής (253): **α.** τα βλαστικά κύτταρα είναι μακρόβια κύτταρα, πολλαπλασιάζονται αργά και παραμένουν στους ιστούς αρκετό χρόνο ώστε να μπορούν να συσσωρευτούν πολλαπλές γενετικές αλλαγές ικανές για νεοπλασματικό μετασχηματισμό, σε αντίθεση με τα σωματικά κύτταρα τα οποία αντικαθίστανται διαρκώς μέσω του περιοδικού κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, τα μακρόβια κύτταρα εκτίθενται σε γενοτοξικές προσβολές πολύ περισσότερο από ότι τα βραχύβια. **β.** Τα μοριακά μονοπάτια, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ιδιότητα αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων (π.χ *Wnt*, *Notch*, *Sonic Hedgehog*, *PTEN*) (81) είναι συχνά απορυθμισμένα σε πολλούς όγκους. **γ.** Τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα μοιράζονται ένα αριθμό φαινοτυπικών χαρακτηριστικών όπως είναι: το σχετικά αδιαφοροποίητο στάδιο, η δυνατότητα αυτοανανέωσης, η ενεργοποίηση κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών (π.χ. η δραστηριότητα τελομεράσης, υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών), καθώς επίσης και η αξιοσημείωτη ικανότητα για μετάσταση. Επίσης, δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο καρκίνος μαστού προκύπτει από κληρονομούμενες ή επίκτητες μεταλλάξεις που προκαλούν απορρύθμιση αυτών των φυσιολογικών μονοπατιών σε βλαστικά και προγονικά κύτταρα, τα οποία περιγράφονται στη δεύτερη υπόθεση.

Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, έχει προταθεί ότι διάφοροι τύποι καρκίνου προκύπτουν από διακριτά προγονικά κύτταρα (254, 255) (Εικόνα 1.22). Σε αυτήν την περίπτωση, είναι αναγκαίο αυτά τα κύτταρα να αποκτήσουν μεταλλάξεις, οι οποίες τους επιτρέπουν να υπόκεινται σε αυτοανανέωση, βασική ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων, αλλά και να διαφοροποιούνται δίνοντας γένεση σε νέους όγκους. Το μονοπάτι διαφοροποίησης ενός βλαστικού κυττάρου σε διαφοροποιημένο κύτταρο, συνήθως εμπλέκει ένα ή περισσότερους ενδιάμεσους κυτταρικούς τύπους. Αυτά τα ενδιάμεσα κύτταρα, είναι περισσότερο άφθονα σε ένα ενήλικα ιστό εν συγκρίσει με τα βλαστικά κύτταρα και ονομάστηκαν ως προγονικά κύτταρα (progenitor or precursor cells). Πρόκειται για κύτταρα μερικώς διαφοροποιημένα, που απαντώνται στον εμβρυικό ή ενήλικα ιστό και συνήθως διαιρούνται για την παραγωγή ώριμων κυττάρων. Ωστόσο,

διατηρούν μερικώς την ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται. Αυτή η ιδιότητά τους μαζί με την αφθονία τους στους ενήλικες ιστούς, οδήγησε πολλούς ερευνητές να θεωρήσουν ότι τα προγονικά κύτταρα θα μπορούσαν να αποτελούν πηγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι η φαινοτυπική ποικιλομορφία των όγκων σε διάφορους ασθενείς μπορεί να προκύπτει από το μετασχηματισμό διαφορετικών υποπληθυσμών καρκινικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων.

Τέλος, έχει προταθεί από αρκετούς ερευνητές το ενδεχόμενο τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα να προκύπτουν από την από-διαφοροποίηση των ώριμων διαφοροποιημένων κυττάρων, τα οποία αποκτούν ιδιότητες που ομοιάζουν με αυτές των βλαστικών κυττάρων (Εικόνα 1.22). Σε αυτό το σενάριο, οι απαιτούμενες γενετικές μεταλλάξεις για την επαγωγή της ογκογένεσης θα πρέπει να είναι ικανές ώστε να οδηγήσουν στη διαδικασία της αποδιαφοροποίησης καθώς και μετέπειτα αυτοανανέωσης στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Η παραγωγή επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα ή όπως έχει χαρακτηριστεί η θεωρία τις αποδιαφοροποίησης, έγκειται στο γεγονός ότι η ικανότητα αυτοανανέωσης μέσω της ασυμμετρικής διαίρεσης ενός φυσιολογικού βλαστικού κυττάρου μπορεί να χαθεί οριστικά και ότι η τελική μοίρα των θυγατρικών κυττάρων είναι να διαφοροποιηθούν και τελικά να οδηγηθούν σε θάνατο (256).

Η θεωρία τις αποδιαφοροποίησης υποστηρίζεται από πρόσφατες μελέτες, όπου έχει αποδειχθεί ότι τα ανθρώπινα ενήλικα σωματικά κύτταρα μπορούν γενετικά να επαναπρογραμματιστούν σε πολυδύναμα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (pluripotency stem cells, iPS) υπερεκφράζοντας μόνο τέσσερις παράγοντες βλαστικότητας (Oct4, Sox2, c-Myc και Klf4) (80). Επίσης τα ανθρώπινα κύτταρα μαστού MCF10A, έπειτα από εξωγενή έκφραση των ανωτέρω παραγόντων Oct4, Sox2, c-Myc και Klf4 (257) μετατράπηκαν σε iPS-like κύτταρα και απέκτησαν τον φαινότυπο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων εκφράζοντας τον αντιγονικό φαινότυπο $CD44^{high}/CD24^{low}$, την πρωτεΐνη ALDH1 καθώς επίσης παρουσίασαν υψηλή ικανότητα ογκογένεσης *in vivo*. Τέλος σε μεταστατικά κύτταρα μαστού, η έκφραση του παράγοντα Klf4 οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων με τον φαινότυπο $CD44^{high}/CD24^{low}$ και κυττάρων ικανών να παράγουν μαμμόσφαιρες (258).



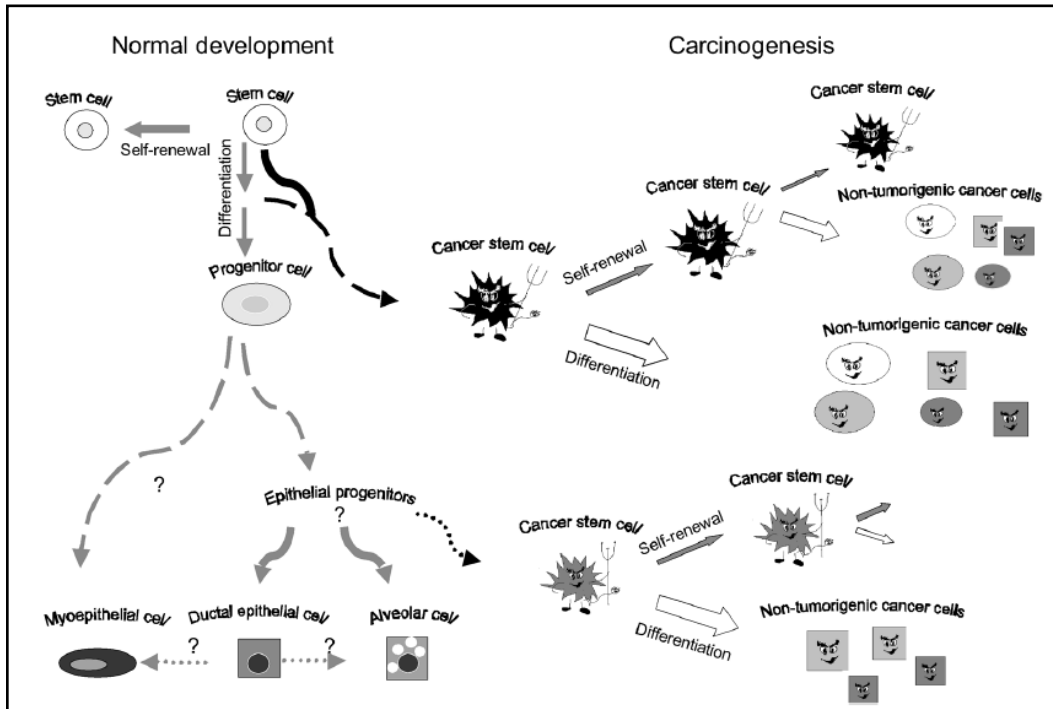
Εικόνα 1.22: Πως μπορεί να προκύψει ένα καρκινικό βλαστικό κύτταρο; Τα υπεύθυνα μοριακά μονοπάτια για την διατήρηση της βλαστικότητας σε ένα βλαστικό κύτταρο είναι επίσης ενεργά σε ποικίλους καρκίνους. Αυτή η ομοιότητα οδήγησε πολλούς ερευνητές στην υπόθεση ότι ο καρκίνος ενδέχεται να προκύπτει μετά από πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα βλαστικό κύτταρο στερώντας του την ικανότητα ρύθμισης του κυτταρικού του κύκλου. Απεικονίζονται 3 σενάρια σύμφωνα με τα οποία ένα καρκινικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να προκύψει όταν: (1) ένα βλαστικό κύτταρο υφίσταται μια μετάλλαξη, (2) ένα προγονικό κύτταρο υφίσταται δύο ή περισσότερες μεταλλάξεις ή (3) ένα πλήρως διαφοροποιημένο κύτταρο υπόκειται σε διάφορες μεταλλάξεις ικανές να το οδηγήσουν πίσω στο επίπεδο του βλαστικού κυττάρου (stem-like state). Και στα 3 σενάρια, το προκύπτον καρκινικό βλαστικό κύτταρο έχει χάσει την ικανότητά του να ρυθμίζει τη δική του κυτταρική διαίρεση.

Ένα επιπλέον στοιχείο στην ανάπτυξη του καρκίνου προκύπτει από το γεγονός ότι τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα απαιτούν στοιχεία από το μικροπεριβάλλον τους για να επιτύχουν την βέλτιστη ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης, ενεργοποίησης και διαφοροποίησης (256). Μια αντίστοιχη έννοια θα μπορούσε να ισχύει και για τα CSCs, τα οποία μπορεί να μην είναι τόσο αυτόνομα όσο πιστευόταν αρχικά. Αν και οι γνώσεις μας σχετικά με την ρύθμιση της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των CSCs είναι

περιορισμένη, διάφορες μελέτες προτείνουν ότι το μικροπεριβάλλον των κυττάρων (CSC niche) διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο. Πιο συγκεκριμένα στον καρκίνο μαστού, τα μεσεγχυματικά κύτταρα θεωρείται ότι υποστηρίζουν τα CSCs μέσω σηματοδότησης που εξαρτάται από τις κυτοκίνες ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και χημειοκίνη C-X-C motif ligand 7 (CXCL7) (259). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο (CSC niche model), το μικροπεριβάλλον αποτελεί μια σημαντική παράμετρο στην ανάπτυξη ενός όγκου, υποδηλώνοντας μια εξήγηση για την αποτυχία επανασχηματισμού όγκων από καρκινικά κύτταρα μετά από εισαγωγή τους σε ποντίκια, καθώς δεν μπορούν να επανασχηματίσουν αυτό το νέο μικροπεριβάλλον τους (256). Ο εντοπισμός των CSCs δίπλα σε στρωματικά κύτταρα *in vivo* υποστηρίζει μια στενή σχέση ανάμεσα στα CSCs και στο μικροπεριβάλλον ως ένα κρίσιμο συστατικό που υπαγορεύει τις ιδιότητες των CSCs (256, 260). Παρόλα αυτά τα σήματα από το μικροπεριβάλλον δεν είναι πάντοτε θετικά ως προς την καρκινογένεση. Παραδείγματα αποτελούν οι αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος (ανοσοαποκρίσεις) (261), οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως ανασταλτικοί παράγοντες καρκινογένεσης καθώς επίσης και η παρεμπόδιση ανάπτυξης όγκων από τα περισσότερο διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα, έπειτα από ξενομεταμόσχευση (xenotransplantation) (250).

Συνοψίζοντας τα ανωτέρω στην περίπτωση του μαστικού αδένου, τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται οδηγώντας στο σχηματισμό του φυσιολογικού αδένου του μαστού. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού προκύπτουν από βλαστικά/προγονικά κύτταρα που έχουν υποστεί γενετικές αλλαγές αλλά έχουν διατηρήσει την δυνατότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται. Ο καρκίνος μαστού, όπως και όγκοι άλλων ιστών, περιέχει ένα ετερογενή πληθυσμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Ένας μικρός πληθυσμός ογκογόνων καρκινικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων έχει την δυνατότητα να αυτοδιπλασιάζεται ενώ η πλειοψηφία των διαφοροποιημένων καρκινικών κυττάρων που σχηματίζουν την μάζα του όγκου (bulk) παρουσιάζουν περιορισμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και είναι ασθενώς ή καθόλου ογκογόνα όταν χορηγηθούν σε ποντίκια. Εντούτοις, πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα CSCs και τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα αποτελούν δυο διακριτές φαινοτυπικά καταστάσεις οι οποίες αλληλομετατρέπονται μεταξύ τους, κατά μία στοχαστική διαδικασία (262).

Αυτό το μοντέλο δεν αποκλείει τον ρόλο που διαδραματίζουν οι παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος, οι οποίοι δύναται να επηρεάζουν τη πιθανότητα μετατροπής ανάμεσα στις δύο κυτταρικές καταστάσεις αλλά επίσης προτείνει ότι η ιεραρχία που απαντάται σε ένα όγκο δεν είναι άκαμπτη και προβλέπει ότι τα CSCs μπορούν να σχηματίζονται εκ νέου (*de novo*) από διαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου.



Εικόνα 1.23: Τα βλαστικά κύτταρα κατά την ανάπτυξη και ογκογένεση του μαστού. Τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα μαστού έχουν προσδιοριστεί από την ικανότητά τους να υπόκεινται σε αυτοανανέωση και να διαφοροποιούνται στις τρεις κυτταρικές σειρές του ώριμου αδένα. Οι όγκοι μαστού μπορούν να προκύψουν από βλαστικά ή προγονικά κύτταρα μέσω απορρόθμισης της φυσιολογικής αυτοανανέωσης. Τα βλαστικά κύτταρα όγκων διατηρούν την ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται. Ο πληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων διατηρείται μέσω αυτοανανέωσης. Η παρεκκλίνουσα διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών παράγει μη ογκογόνους προγόνους, που αντιπροσωπεύουν το κύριο/μεγαλύτερο μέρος του όγκου (*the bulk of the tumour*).

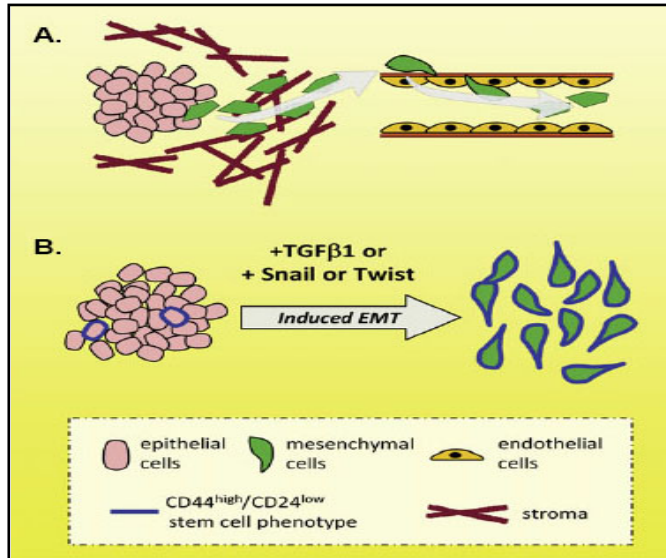
1.12. EMT και επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων

Κατά τη διάρκεια της μετάστασης όγκων, η οποία συχνά καθίσταται εφικτή με την επαγωγή της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάπτωσης (EMT) (263), τα διασπειρόμενα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται να αποκτούν ικανότητα αυτοανανέωσης προκειμένου να παράγουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αυτό τονίζει την πιθανότητα ότι η

μετάπτωση EMT, η οποία από την μια καθιστά ικανή την διασπορά των καρκινικών κυττάρων, μπορεί επίσης να μεταδίδει τη δυνατότητα αυτοανανέωσης στα διασπειρόμενα καρκινικά κύτταρα. Με αυτή την έννοια, η διαδικασία μετάστασης μπορεί να θεωρηθεί ίδια με τις ανάλογες διαδικασίες κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης και αναγέννησης ιστών οι οποίες καθιστούν ικανά τα βλαστικά κύτταρα ενηλίκων να εξέρχονται από τις δεξαμενές ιστών (*tissue reservoirs*), όπως ο μυελός των οστών, να εισέρχονται και να επιβιώνουν στην κυκλοφορία του αίματος αλλά και να μεταναστεύουν σε δευτερογενείς θέσεις ιστών όπου πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και συμμετέχουν στην ιστική ανασυγκρότηση (264).

Ενδιαφέρον δε αποτελεί το γεγονός ότι ανθρώπινα και ποντικίσια επιθηλιακά κύτταρα μαστού που υποβάλλονται σε EMT συμπεριφέρονται, από πολλές απόψεις, όμοια με τα βλαστικά κύτταρα φυσιολογικών ή νεοπλασματικών ιστών (234). Τα εν λόγω κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού μαμμοσφαιρών, μια ιδιότητα που συνδέεται με τα επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα μαστού.

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι είναι δυνατή η επαγωγή έκφρασης του αντιγονικού φαινοτύπου των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μαστού ($CD44^{high}/CD24^{low}$) σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, μετά από έκθεσή τους με την κυτοκίνη TGF- β 1 για 12 ημέρες ή μετά από υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων-επαγωγέων της EMT Snail ή Twist (Εικόνα 1.24) (234). Ο προκύπτων πληθυσμός είναι μεσεγχυματικής μορφολογίας και σχηματίζει μαμμόσφαιρες συσχετίζοντας ότι η μετάπτωση EMT οδηγεί στην απόκτηση διηθητικών και μεταναστευτικών ιδιοτήτων αλλά και ιδιοτήτων βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα μαστού. Το γεγονός αυτό, ότι η EMT είναι επαρκής για την επαγωγή ενός πληθυσμού με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων, επισημαίνει την υπάρχουσα πιθανότητα ότι οι διαδικασίες με τις οποίες η EMT παράγει διάφορους κυτταρικούς τύπους από το μεσόδερμα μπορεί να συσχετίζεται με τις διαδικασίες γένεσης του μαστικού αδένα από τα προγονικά κύτταρα μαστού (265). Ακόμη, πειράματα σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα μαστού (HMEC), έπειτα από ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras-MAPK και επακόλουθης EMT, οδήγησε στην επαγωγή ογκογόνων χαρακτηριστικών και παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων (266).



Εικόνα 1.24: Η EMT είναι μια αναπτυξιακή διαδικασία που μπορεί να ενεργοποιηθεί υπό παθολογικές συνθήκες. (A) Η καρκινογένεση διευκολύνει τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων στα λεμφικά αγγεία και στην κυκλοφορία του αίματος με επακόλουθο τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων. (B) Πειραματικά η επαγωγή EMT σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού παράγει κύτταρα με τον φαινότυπο $CD44^{high}/CD24^{low}$, ένας φαινότυπος που έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης καρκινικών βλαστικών κυττάρων μαστού

Συνοψίζοντας τα παραπάνω θα μπορούσε να ειπωθεί ότι υπάρχει ένας άρρηκτος σύνδεσμος μεταξύ της επαγωγής EMT, εμφάνισης καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs) και φαινοτύπου $CD44^{high}/CD24^{low}$ (234, 265, 266). Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι επαγωγείς της EMT μπορούν να αυξάνουν το κακοήθη δυναμικό των καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση είναι πιθανόν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα να μην αποτελούν ξεχωριστές οντότητες αλλά καρκινικά κύτταρα τα οποία παροδικά αποκτούν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων ως συνέπεια της EMT (265).

1.13 ΣΚΟΠΟΣ

Το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης ορίζεται ως αύξηση ρετροτρανσποζονιακών αντιγράφων/ενσωματώσεων στο γένωμα. Η σπουδαιότητα του έγκειται στη παραγωγή μεταλλάξεων, μέσω εισαγωγικής μεταλλαξιγένεσης, που στοιχειοθετούνται από 65 γνωστές ανθρώπινες γενετικές ασθένειες. Οι νέες ρετροτρανσποζονιακές ενσωματώσεις δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν πληθώρα αποτελεσμάτων όπως: μεταγραφική απορρύθμιση ή/και γονιδιακή έκφραση, θραύση DNA, αυξημένη συχνότητα ανασυνδιασμού μέσω ρετροτρανσποζονιακών αντιγράφων και γενωμική ανασυγκρότηση, αδρανοποίηση ογκοκατασταλατικών γονιδίων ή ενεργοποίηση ογκογονιδίων και γενωμική αστάθεια που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Οξείες μυελογενείς λευχαιμίες, καρκίνος εντέρου, καρκίνος ωοθηκών και καρκίνος μαστού αποτελούν παραδείγματα κακοηθειών που έχουν συσχετιστεί με τη δράση ρετροτρανσποζονίων.

Η EMT διαδραματίζει κύριο ρόλο κατά την εμβρυογένεση, ενώ η επαγωγή της κατά την ενήλικη ζωή οδηγεί σε παθολογικές συνέπειες και στην καρκινογένεση. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού, η EMT συνδέεται με την παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSC) που χαρακτηρίζονται: από την ικανότητα τους να παράγουν μαμμόσφαιρες με αντιγονικό φαινότυπο $CD44^{high}/CD24^{low}$ και να οδηγούν σε ογκογένεση σε ποντίκια.

Η σημασία του καρκίνου του μαστού έγκειται στο ότι αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου και κύρια αιτία θανάτου σε γυναίκες. Παρόλο, που πολλές μελέτες έχουν προσδιορίσει διάφορους παράγοντες κινδύνου όπως: ηλικία, διατροφή, ορμονικό ισοζύγιο και γενετική προδιάθεση, δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη μια ξεκάθαρη θεμελιώδης, γενεσιουργή αιτία για την συγκεκριμένη ασθένεια. Βιβλιογραφικά δεδομένα παρέχουν ενδείξεις εμπλοκής της ρετρομετάθεσης στον καρκίνο μαστού και αναφέρονται σε ανακατατάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο BRCA1 μέσω ρετροτρανσποζονιακού ανασυνδιασμού και την ενεργοποίηση του πρωτο- ογκογονιδίου c-myc μέσω ενσωμάτωσης ενός ρετροτρανσποζονιακού αντιγράφου L1. Το Εργαστήριό μας έχει αποδείξει ότι η συχνότητα ρετρομετάθεσης του LTR-ρετροτρανσποζονίου VL30 επάγεται σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα μετά από μόλυνση με τον ογκογόνο ιό SV40 ή επίδραση με καρκινογόνα βαρέα μέταλλα.

Στηριζόμενοι στα ανωτέρω, χρησιμοποιώντας επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού και το μοντέλο ρετρομετάθεσης τριών ανασυνδιασμένων ρετροτρανσποζονίων (VL30,

LINE-1 και DO.MT), σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η πιθανή συσχέτιση της ρετρομετάθεσης με την επαγωγή EMT, παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων, καρκινογένεση και κατεπέκταση στην εξήγηση της γενετικής βάσης και του μηχανισμού επαγωγής EMT, ως κρίσιμο γεγονός έναρξης της καρκινογένεσης. Τέλος, στόχος μας ήταν η εγκαθίδρυση (establishment) ενός *in vitro* ρετροτρανσποζονιακού μοντέλου-κυτταρικού συστήματος μελέτης EMT/ καρκινογένεσης αλλά και αναστολής ή και επαγωγικού θανάτου καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

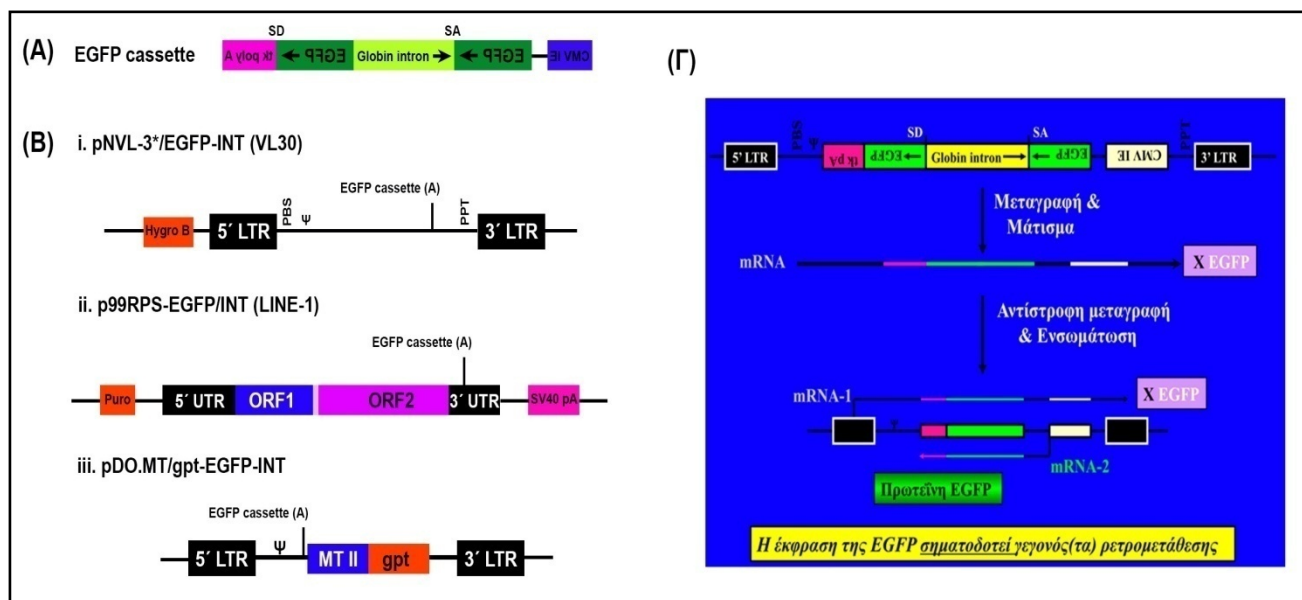
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιγραφή ενός ανασυνδιασμένου στοιχείου VL30/EGFP για τη μελέτη της ρετρομετάθεσης

Το εργαστήριό μας έχει κατασκευάσει ένα ανασυνδιασμένο στοιχείο VL30 που φέρει κλωνοποιημένη μια κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης και βασίζεται στην έκφραση της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης (104). Η κασέτα δομικά αποτελείται από το γονίδιο EGFP (Εικόνα 2.1), που η έκφρασή του οδηγείται από τον υποκινητή CMV και διακόπτεται από το γ-ιντρόνιο της σφαιρίνης, το οποίο έχει αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς αυτόν (60). Πριν την πραγματοποίηση ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης, τα μετάγραφα της EGFP πρωτεΐνης από τον υποκινητή CMV, περιέχουν το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης σε αντίθετη μεταγραφική φορά, με αποτέλεσμα να μην μπορεί παραχθεί λειτουργική EGFP πρωτεΐνη. Αντιθέτως, κύτταρα εκφράζουν τη πρωτεΐνη μόνο: όταν μετά την μεταγραφή του, το μετάγραφο του VL30 υφίσταται μάτισμα (*splicing*) (αποκοπή του ιντρονίου της γ-σφαιρίνης), αντιστροφή μεταγραφή και ενσωμάτωσή του σε μια νέα θέση στο γένωμα, που προσομοιάζει την διαδικασία ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης.

Να σημειωθεί ότι ως εκπρόσωπος των στοιχείων VL30, επιλέχθηκε το στέλεχος NVL-3/9 λόγω του ότι είναι από τα πιο μεταγραφικώς ενεργά ρετρομεταθετά στοιχεία VL30. Επίσης από το αρχικό στοιχείο VL30 μεγέθους 4.83 Kb, έχουν απομακρυνθεί εσωτερικές αλληλουχίες, μεγέθους 2.55 Kb, αφήνοντας όμως ακέραια την πριμοδοτική θέση πρόσδεσης PBS, το σήμα πακεταρίσματος Ψ και την πολυουρινική περιοχή PPT (Εικόνα 2.1 Bi) .

Στην ίδια λογική έχουν χρησιμοποιηθεί και οι ακόλουθες ανασυνδιασμένες κατασκευές: του ανθρώπινου ρετροτρανσποζονίου LINE-1, 99-RPSEGFP/INT (προσφορά Kazazian HH, PA, USA) (Εικόνα 2.1 B i)(60) και pDO.MT/gpt-EGFP-INT (κατασκευασμένη από το εργαστήριό μας αλλά αδημοσίευτη) (Εικόνα 2.1 Biii).



Εικόνα 2.1: Δομή ανασυνδιασμένων ρετροτρανσποζονίων και λογική ανίχνευσης ρετρομετάθεσης. (A) Η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης δομικά αποτελείται από το γονίδιο EGFP που η έκφρασή του οδηγείται από τον υποκινητή CMV και καταλήγει σε tk poly-A ουρά. Το γονίδιο EGFP διακόπτεται από το γ-ιντρόνιο της σφαιρίνης, το οποίο έχει αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς αυτό. (A) **i.** Το ανασυνδιασμένο στοιχείο pNVL-3*/EGFP-INT, αποτελείται από το στοιχείο VL30 (pNVL-3/9), στο οποίο έχουν αφαιρεθεί οι εσωτερικές αλληλουχίες, μεγέθους 2.55 Kb, (αφήνοντας ακέραια την πριμοδοτική θέση πρόσδεσης PBS, το σήμα πακεταρίσματος Ψ και την πολυουρινική περιοχή PPT), την κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης EGFP (A) και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη (Hygro B). **ii.** Η ανασυνδιασμένη κατασκευή του ανθρώπινου ρετροτρανσποζονίου LINE-1, 99-RPS-EGFP/INT φέρει κλωνοποιημένη της κασέτα EGFP στην περιοχή 3'UTR και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουργομυκίνη (puro). **iii.** Η ανασυνδιασμένη κατασκευή pDO.MT/gpt-EGFP-INT φέρει κλωνοποιημένη της κασέτα EGFP καθοδικά του 5'LTR και το γονίδιο ανθεκτικότητας φωσφοριβοσυλικής μεταφοράς γουανίνης-ξανθίνης (gpt), (Γ) Η λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης βασίζεται στην έκφραση της πρωτεΐνης EGFP και προϋποθέτει την παραγωγή του ανασυνδιασμένου ρετροτρανσποζονιακού μετάγραφου VL30, μάτισμα και απομάκρυνση του ιντρονίου γ-σφαιρίνης, αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση στο γένομα. Τα βέλη στα σημεία VL30 5'LTR και στον υποκινητή CMV IE, υποδηλώνουν τα αντίστοιχα σημεία έναρξης της αντιγραφής του ανασυνδιασμένου στοιχείου VL30 και της πρωτεΐνης EGFP.

2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η in vitro καλλιέργεια κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικά κατεργασμένα πλαστικά σκεύη, στα οποία τα κύτταρα προσκολλώνται στη επιφάνειά των,

σχηματίζοντας κυτταρικό ταπήτιο, υπό συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές της φυσιολογικής ανάπτυξής τους. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις, τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό στείρες συνθήκες σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο/δωμάτιο με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Επίσης, όλοι οι απαραίτητοι χειρισμοί έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής (AURA 2000 MAC, BioAir Instruments). Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO₂ Water-jacketed Incubator) σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη σε 5% (v/v) CO₂, προκειμένου να διατηρείται το pH σταθερό. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων (Olympus, IM).

2.2.2 Κυτταρικές σειρές

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στις κυτταρικές σειρές μαστού ποντικού HC11, EPH4 και C127. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και οι κυτταρικές σειρές NIH3T3 και SVTT1.

2.2.2.1 HC11: Κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων μαστού προερχόμενη από τα αθανатоποιημένα επιθηλιακά κύτταρα COMMA-1D, τα οποία έχουν απομονωθεί από αδένα μαστού ψευδοεγκυμονούσας BALB/c μύς. Η κυτταρική σειρά HC11 αποτελείται από προγονικά κύτταρα μαστού ποντικού, διατηρεί σημαντικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των φυσιολογικών κυττάρων μαστού, συμπεριλαμβανομένων μορφογενετικών δυνατοτήτων *in vivo* και έχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων.

2.2.2.2 EPH4 (J3B1): Μη-ογκογόνα κυτταρική σειρά, προερχόμενη από αυθόρμητα αθανатоποιημένα επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού. Μορφολογικά εκφράζουν έντονα την πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων.

2.2.2.3 C127: Κυτταρική σειρά που προέρχεται από όγκο μαστού ποντικού. Εντούτοις, είναι μη-ογκογόνα κυτταρική σειρά, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για πειράματα κυτταρικού μετασχηματισμού (transformation assays), λόγω της φυσιολογικής εμφάνισής τους και της χαμηλής συχνότητας αυθόρμητου μετασχηματισμού.

2.2.2.4 NIH3T3: Σταθερή, αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών κυττάρων μύς

2.2.2.5 SVTT1: Σταθερά μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά που προήλθε από μόλυνση κυττάρων NIH3T3 με τον ιό SVLTR1, ανασυνδυασμένος ιός SV40

2.2.3 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

2.2.3.1 Θρεπτικά υλικά

Για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν τα ανάλογα θρεπτικά υλικά:

α) Για την κυτταρική σειρά HC11: χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 που περιείχε 2 mM L-γλουταμίνη. Σε αυτό προστέθηκαν 10% κατ' όγκο εμβρυϊκός ορός βοός (FCS), 10 ng/ml ινσουλίνη, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) και 100 U αμπικιλίνη/100 μg στρεπτομυκίνη.

β) Για την κυτταρική σειρά EPH4: χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM/χαμηλής γλυκόζης εμπλουτισμένο με 10% ορό DBS και 100 U αμπικιλίνη/ 100 μg στρεπτομυκίνη.

γ) Οι κυτταρικές σειρές C127, NIH3T3 και SVTT1, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS. Σε αυτό προστέθηκαν επίσης, 2 mM L-γλουταμίνη (Sigma) καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, όπως ανωτέρω.

2.2.3.2 Διάλυμα έκπλυσης

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Το διάλυμα PBS έχει pH 7.2 και στερείται ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , για την καλύτερη λειτουργία του παγκρεατικού ενζύμου θρυψίνη. Η σύσταση του έχει ως εξής: 139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.44 mM KH_2PO_4 και 4.16 mM NaHCO_3 .

2.2.3.3 Διάλυμα θρυψίνης/EDTA

Για τη επίτευξη της διαδικασίας θρυψινοποίησης και αποκόλλησης των κυττάρων από το ταπήτιο των πλαστικών σκευών κυτταροκαλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης/EDTA (PAA) 0.05%/0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ελλειμματικό σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Το χηλικό αντιδραστήριο EDTA έχει την ικανότητα να δεσμεύει

δισθενή κατιόντα (Ca^{2+} και Mg^{2+}) από τα κύτταρα, καθιστώντας τα ανίκανα να παραμένουν προσδεμένα στην επιφάνεια ανάπτυξής των. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συλλέγονται ως εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό. Το θρεπτικό υλικό αδρανοποιεί την δράση του ενζύμου. Η δράση της θρυψίνης είναι καταστρεπτική για τα κύτταρα όταν αυτά εκτεθούν για μεγάλη χρονική διάρκεια. Επίσης το pH του ενζύμου δεν πρέπει να είναι μικρότερο του 7, καθώς τέτοιες τιμές μειώνουν τη δραστηριότητά του, αλλά επιπλέον δεν πρέπει να ξεπερνά το 8, τιμές καταστρεπτικές για τα κύτταρα. Το διάλυμα θρυψίνης/EDTA διατηρείται σε θερμοκρασία 4⁰C.

2.2.4 Αραιώση και επανακαλλιέργεια κυττάρων

Λόγω του συνεχούς εκθετικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αναγκαία συνθήκη για την συντήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας είναι η αραιώση και επανακαλλιέργεια σε μικρότερη συγκέντρωση ή η μεταφορά των σε μεγαλύτερα σκεύη κυτταροκαλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας, τότε πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια των κυττάρων μέσω της διαδικασίας θρυψινοποίησης:

Το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα θρυψίνης και τα κύτταρα επωάζονται στον επωαστικό κλίβανο στους 37⁰C για 3 λεπτά. (Για φιάλη 75cm χρησιμοποιείται 1ml θρυψίνης, ενώ για φιάλη 25cm προστίθεται 0,5ml θρυψίνης). Ακολουθεί προσθήκη του ανάλογου όγκου θρεπτικού μέσου σύμφωνα με την επιθυμητή αραιώση και πραγματοποιείται καλή ανάδευση, ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία μονήρων κυττάρων και να αποφευχθεί η παραμονή συσσωμάτων στο εναιώρημα. Το κυτταρικό αιώρημα μεταφέρεται είτε σε σκεύος μεγαλύτερης επιφάνειας ανάπτυξης ή αραιώνεται σε μικρότερη συγκέντρωση κυττάρων και συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό μέχρι τον προκαθορισμένο τελικό όγκο.

2.2.5 Αποθήκευση κυττάρων (*stock*)

Τα καλλιεργούμενα μετά από πειραματικούς χειρισμούς κύτταρα μπορούν να αλλάξουν ιδιότητες, όπως ο ρυθμός αύξησής των, η έκφραση αντιγόνων και το προφίλ των ισοενζύμων τους. Λόγω αυτού, θεωρείται σκόπιμη η αποθήκευση των κατά τις

πρώτες κυτταρικές γενεές. Για τη αποθήκευση των κυττάρων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Καταρχήν αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS. Στην συνέχεια τα κύτταρα θρυψινοποιούνται με το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, όπως περιγράφεται ανωτέρω και ακολούθως επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωληνάριο τύπου universal και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500xg για 3 λεπτά, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Sorvall® TC6). Μετά το πέρας των 3 λεπτών αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 720μl εμβρυϊκού ορού βοός (FCS). Τα κύτταρα μαζί με τον ορό μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάρια ψύξης (cryovials NUNC™), στα οποία προηγουμένως είχαν προστεθεί 80 μl διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η αναλογία όγκων FCS/DMSO πρέπει να αντιστοιχεί σε 9:1, ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι $4-5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml υλικού αποθήκευσης. Το αντιοξειδωτικό αντιδραστήριο DMSO προστίθεται στο υλικό αποθήκευσης με σκοπό να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων νερού που θα οδηγούσε στην καταστροφή των κυττάρων. Τέλος, λόγω της ιδιότητας του DMSO να αυξάνει τη θερμοκρασία του ορού, τα σωληνάρια τοποθετούνται αρχικά στους -80°C για 4 ώρες και εν συνεχεία μεταφέρονται σε υγρό άζωτο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η σταδιακή ψύξη των κυττάρων και η αποθήκευση των για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

2.2.6 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων σε καλλιέργεια μέσω λιπιδίων (*transfection*)

Για την *in vitro* μελέτη των επιπτώσεων των ανασυνδυασμένων ρετροτρανσποζονίων σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού του μύος HC11, C127 και EPH4, δημιουργήθηκαν σειρές κυττάρων/κλώνοι που εκφράζουν τα ρετροτρανσποζόνια. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαμόλυνσης μέσω λιπιδίων PolyFect® (Qiagen). Το αντιδραστήριο PolyFect σχηματίζει θετικά φορτισμένες συμπαγείς δομές με το πλασμιδιακό DNA, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η πρόσδεση τους σε αρνητικά φορτισμένους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και κατά συνέπεια η μεταφορά ακέραιου DNA στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών είναι η εξής:

15 x 10⁴ κύτταρα από τις σειρές HC11, EPH4 & C127 αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 6 cm για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο. Την επόμενη ημέρα και αφού τα κύτταρα κατέλαβαν περίπου το 70% της επιφάνειας του τρυβλίου, διαμολύνθηκαν με τη χρήση λιποσωμάτων (Polyfect, Qiagen) με το προς μελέτη ανασυνδιασμένο πλασμίδιο.

2.5 μg πλασμιδιακού DNA αραιώθηκε σε θρεπτικό υλικό, το οποίο δεν περιείχε ορό και αντιβιοτικά, σε τελικό όγκο 150 μl και αναδεύθηκε με Vortex για 5 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 15 μl από το αντιδραστήριο Polyfect, με επακόλουθη ανάδευση με Vortex για 10 δευτερόλεπτα και το διάλυμα αφήθηκε για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να σχηματιστούν τα σύμπλοκα DNA/PolyFect. Στη διάρκεια των δέκα λεπτών τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και προστέθηκαν 3 ml θρεπτικού υλικού, εμπλουτισμένου με 10% ορό. Μετά την πάροδο των 10 λεπτών, προστέθηκε στο διάλυμα διαμόλυνσης 1 ml θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 10% ορό ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Το προκύπτον διάλυμα προστέθηκε στάγδην στο τρυβλίο κυτταρικής καλλιέργειας.

Με το πέρασ 48 ωρών από την διαμόλυνση, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλαστική φιάλη 75 cm. Μετά από 24 ώρες κυτταρικής ανάπτυξης ακολούθησε επιλογή των ανθεκτικών κυττάρων, με το κατάλληλο αντιβιοτικό, για κάθε πλασμίδιο.

Τα κύτταρα HC11-VL30, C127-VL30 & EPH4-VL30 επιλέχθηκαν παρουσία 50 μg/ml αντιβιοτικού υδρομυκίνη για περίπου 20 ημέρες, τα κύτταρα HC11-L1 παρουσία 2μg/ml πουρομυκίνη για 7 ημέρες. Επίσης, τα κύτταρα HC11-DO.MT επιλέχθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε: 10mM ZnCl₂, 25 mg/ml ξανθίνη και 12.5 mg/ml μυκοφαινολικό οξύ. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων HC11, C127 και EPH4 με το πλασμίδιο pEGFP-N1, ως μάρτυρας και τα κύτταρα HC11-EGFP, C127-EGFP, EPH4-EGFP επιλέχθηκαν με 400μg/ml G418 για 15 ημέρες. Οι παραχθείσες ανθεκτικές πλέον αποικίες, από κάθε διαμόλυνση απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν ως μονήρεις κλώνοι σε πλαστικές φιάλες.

2.2.7 Μικροσκοπία φθορισμού (*Fluorescence microscopy*)

Η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης του ρετρομεταθετού στοιχείου VL30, βασίζεται στην έκφραση της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP, μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης. Για να επιτευχθεί η ανίχνευση των θετικών EGFP-φθορίζοντων

κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

Τα προς εξέταση κύτταρα ενοφθαλμίζονται και αφήνονται προς ανάπτυξη σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες σε τρυβλίο διαμέτρου 6 cm. Την επόμενη ημέρα και αφού καταλάβουν περίπου το 70% της διαθέσιμης επιφάνειας του τρυβλίου, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 3 ml διαλύματος PBS και ακολούθως μονιμοποιούνται με 3 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (w/v) 3.8% σε PBS για χρονικό διάστημα 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό μονιμοποίησης και τα κύτταρα επιάζονται για 5 λεπτά σε 3 ml διαλύματος σβέσης (*quenching*) 50 mM NH_4Cl 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 τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, με τη χρήση διαλύματος επικάθησης και παρεμπόδισης αποχρωματισμού DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation)

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon eclipse E400) με λάμπα υψηλής πίεσης (HBO 100 W) και φίλτρο FITC (530 nm μέγιστο διέγερσης) και φωτογραφήθηκαν με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) σε μεγέθυνση 400X.

2.2.8 Εξέταση κυττάρων για ικανότητα σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης (*anchorage-independent growth test*)

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της ικανότητας σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης και κατ' επέκταση την εξακρίβωση κυτταρικού μετασχηματισμού είχε ως εξής:

Ως αρχικό βήμα, ετοιμάστηκαν 50 ml διαλύματος 2.4% αγαρόζης σε d.H₂O. Το διάλυμα αγαρόζης αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το ζεστό αποστειρωμένο διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται σε υδατόλουτρο των 48 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί (15-20 λεπτά). Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η διαδικασία πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες στην εστία κάθετης νηματικής ροής. 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 μ l 10mg/ml insulin, 0.5 μ l 1 μ g/ μ l EGF, 10 ml FCS], εμπλουτισμένου με 20% FCS προθερμαίνεται στους 48 °C. Στην συνέχεια αναμειγνύονται 30 ml διαλύματος 2.4% αγαρόζης με 30 ml θρεπτικού μέσου 2 X RPMI 1640, εμπλουτισμένου με 20% FCS. Το προκύπτον μείγμα συγκεντρώσεως 1,2% σε αγαρόζη, χρησιμοποιείται ως βασική στοιβάδα αγαρόζης και 6-7 ml αυτού μεταφέρονται σε τρυβλία διαμέτρου 6 cm. Το υπόλοιπο του μείγματος διατηρείται στο υδατόλουτρο των 48 °C.

Επόμενο βήμα αποτελεί η θρυψινοποίηση των προς εξέταση κυττάρων. Από κάθε εξεταστέα περίπτωση αναμειγνύονται 400.000 κύτταρα (σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο 1 X RPMI/10% FCS) με 1.2% διαλύματος αγαρόζης (σε dH₂O), σε ίσους όγκους (1/1 ή 1,5/1,5 ml). Τα κύτταρα στο προκύπτον 0.6% διάλυμα αγαρόζης, περιχύνονται στη βασική στοιβάδα αγαρόζης και αφήνονται να στερεοποιηθούν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα τρυβλία τοποθετούνται σε τάπερ μαζί με 2 ποτήρια ζέσεως αποστειρωμένου διαλύματος PBS, ώστε να αποφευχθεί η εκτεταμένη εξάτμιση του θρεπτικού υλικού και μεταφέρονται στον κλίβανο ανάπτυξης για χρονικό διάστημα 10-30 ημερών. Οι καλλιέργειες των κυττάρων θρέφονται ανά 3-4 ημέρες με 1 ml κανονικού 1 X RPMI/10% FCS. Οι καλλιέργειες παρατηρούνται σε μικροσκόπιο για πιθανή δημιουργία εστιών και το προκύπτον αποτέλεσμα φωτογραφείται με την βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) σε μεγέθυνση 20X και 40X.

2.2.9 Εξέταση ικανότητας επιβίωσης και σχηματισμού μαμμόσφαιρων υπό συνθήκες ελαττωμένης προσκόλλησης

Θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι HC11-VL30 και HC11-L1 αφήνονται προς ανάπτυξη σε σκεύη μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης (βακτηριακά τρυβλία). Με την βοήθεια της ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) φωτογραφείται η εξέλιξη ανάπτυξης των κυττάρων για πάροδο χρόνου 10 ημερών καλλιέργειας.

2.2.10 Εξέταση ικανότητας αυτοανανέωσης (*self-renewal test*) μαμμόσφαιρων

Για να εξεταστεί η ικανότητα αυτοανανέωσης των σχηματιζόμενων μαμμόσφαιρων σε βακτηριακά τρυβλία, πραγματοποιείται η ακόλουθη διαδικασία:

Κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων αναπτύσσονται σε σκεύη μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. Στη συνέχεια οι επιπλέουσες στο υπερκείμενο μαμμόσφαιρες συλλέγονται και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal και ακολουθεί φυγοκέντρηση 1500 x g για 3 λεπτά. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται 2 φορές με 5 ml διαλύματος PBS, μετά από φυγοκέντρηση στις προαναφερθείσες συνθήκες. Το ίζημα επαναιωρείται σε 0.5 ml διαλύματος PBS και έπειτα στο εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται 0.5 ml θρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 λεπτά στους 37 °C και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml κανονικού θρεπτικού υλικού RPMI 1640. Πραγματοποιείται ανάδευση με πιπέτα και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, όπως ανωτέρω. Τέλος, στο προκύπτον ίζημα προστίθεται 1 ml κανονικού θρεπτικού υλικού RPMI 1640, υπό ανάδευση με πιπέτα, και τα μονήρη πλέον κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν σε βακτηριακά τρυβλία. Μετά το πέρας 30 λεπτών από την τοποθέτηση των κυττάρων στα βακτηριακά τρυβλία, τα μονήρη κύτταρα φωτογραφούνται με την βοήθεια της ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990), σε μεγέθυνση 40X. Η εξέλιξη πολλαπλασιασμού των κυττάρων παρακολουθείται σε μικροσκόπιο και πραγματοποιείται φωτογράφιση μετά από 2 και 5 ημέρες καλλιέργειας των.

2.2.11 Διάκριση κυτταρικών τύπων μαμμόσφαιρας με Αιματοξυλίνη

Μονήρη κύτταρα μαμμοσφαιρών αφήνονται προς ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία για 15 ημέρες. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, οι παραγόμενοι κυτταρικοί τύποι μονιμοποιούνται και βάφονται με την βοήθεια διαλύματος Αιματοξυλίνης, σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

Ως πρώτο βήμα πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού και ακολουθούν δύο πλύσεις με διάλυμα PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται με την προσθήκη 10 ml 100% αιθανόλης για 3 λεπτά. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται και ακολούθως προστίθενται 10 ml 70% αιθανόλης για 3 λεπτά. Στη συνέχεια αφού τα κύτταρα πλυθούν με νερό βρύσης για 5 λεπτά προστίθενται 10 ml διαλύματος Αιματοξυλίνης για 6 λεπτά. Μετά το πέρας των 6 λεπτών πραγματοποιείται μια τελευταία πλύση με νερό βρύσης για διάστημα 20 λεπτών και το δείγμα παρατηρείται σε

μικροσκόπιο. Οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι φωτογραφίζονται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Nikon CoolPix 990), σε μεγέθυνση 40X.

2.2.12 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (CIM-PLATES), τα οποία χωρίζονται σε 2 υποθαλάμους. Στον πάτο του επάνω υποθαλάμου βρίσκεται μεμβράνη PET (polyethyleneterephthalate) με μικροπόρους, η οποία φέρει μικροηλεκτρόδια ενσωματωμένα στην κάτω πλευρά της. 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 έχει ως εξής:

Αρχικά προστέθηκαν 160 μl θρεπτικού υλικού με ορό στον κάτω υποθάλαμο του CIM plate. Στην συνέχεια αφού τοποθετήθηκε ο επάνω υποθάλαμος προστέθηκαν 35μl θρεπτικού υλικού χωρίς ορό, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της μεμβράνης. Το CIM plate αφήθηκε για μια ώρα στον κλίβανο επώασης και ακολούθως τοποθετήθηκε στο μηχάνημα ώστε να μηδενίσουμε το θόρυβο (background).

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η προετοιμασία των κυττάρων. Τα κύτταρα πριν θρυψινοποιηθούν αφήθηκαν για 2 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (serum starvation). Κατόπιν αφού προστέθηκαν 5000 κύτταρα/100 μl σε κάθε well plate, τα κύτταρα αφήθηκαν 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.

2.2.13 Κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης (growth curves) με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence με και την χρήση ειδικών πολυτρυβλίων (e-plates).

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (e-plates), τα οποία φέρουν μικροηλεκτρόδια ενσωματωμένα στην κάτω πλευρά τους. Μέσω των μικροηλεκτροδίων το μηχάνημα καταγράφει ανά χρονική στιγμή την κατάσταση των κυττάρων.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

Αρχικά αφού προστέθηκαν 100 μl θρεπτικού υλικού σε συγκέντρωση ορού 10-, 5-, 2.5- και 1.25% στο e-plate. Αυτό μεταφέρθηκε στο μηχάνημα και μηδενίστηκε ο θόρυβος (background). Ακολούθησε θρυψινοποίηση των κυττάρων, τα οποία μοιράστηκαν σε 4 φυγοκεντρικά σωληνάρια και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 xg για 3 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 10-, 5-, 2.5- και 1.25% ορού αντίστοιχα. Ακολούθως, 5.000 κύτταρα/100 μl ανά περίπτωση συγκέντρωσης ορού προστίθενται σε κάθε well plate. Χρησιμοποιήσαμε κύτταρα μάρτυρες HC11 και 2 κλώνους HC11-VL30 Cl.12 & 19 και HC11-L1 Cl.1 & 6. Τα κύτταρα αφήνονται να κολλήσουν για 30 λεπτά. Τέλος, μετά το πέρας των 30 λεπτών το e-plate τοποθετήθηκε στο μηχάνημα που βρίσκεται στον επωαστικό κλίβανο ώστε να αρχίσει η μέτρηση για την κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης.

2.2.14 Ανάπτυξη θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων σε matrigel .

Για να εξετάσουμε την ικανότητα διήθησης των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων χρησιμοποιήσαμε την υποστηρικτική ουσία/γέλη Matrigel σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: Αρχικά πραγματοποιήθηκε ολονύχτια απόψυξη της γέλης Matrigel από τους -70 °C στους 4 °C. Την επόμενη μέρα, πολυτρυβλία 24-well plates επιστρώθηκαν με τη γέλη Matrigel και αφέθηκαν για 30 λεπτά στους 37 °C. Η ουσία/γέλη Matrigel αποτελεί εκχύλισμα πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης που προέρχονται από τον όγκο EHS (Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma) και σχηματίζει μια τρισδιάστατη γέλη στους 37°C. Ακολούθως, 10.000 κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30, HC11-L1 και μαρτύρων HC11 αφέθηκαν προς ανάπτυξη στα επιστρωμένα με Matrigel πολυτρυβλία. Η εξέλιξη των κυττάρων φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Nikon CoolPix 990).

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΛΩΝΩΝ

2.3.1 Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA για ανάλυση PCR

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA έχει ως εξής:

Αρχικά κύτταρα αναπτύσσονται σε πλαστική φιάλη 75 cm². Έπεται θρυψινοποίηση και μέτρηση 1,5X10⁶ κυττάρων με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου Neubuer, τα οποία συλλέγονται σε 4 ml κανονικού θρεπτικού υλικού RPMI σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το θρεπτικό υλικό αναρροφάται και το ίζημα των κυττάρων αιωρείται σε 4 ml PBS. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml PBS, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται 1500xg για 3 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης [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 πρωτεϊνάση 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 πρωτεϊνάση K, και ακολούθως αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπεται φυγοκέντρηση 1600xg για 3 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (erpendorf). Το κυτταρικό εκχύλισμα DNA συντηρείται στους 4°C, έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.3.2 Ανάλυση PCR

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) είναι μια δυναμική μέθοδος ποσοτικής αύξησης τμήματος DNA που διεκπεραιώνεται *in vitro*

με τη χρησιμοποίηση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η μέθοδος PCR προϋποθέτει τη γνώση της αλληλουχίας η οποία θα αυξηθεί, όπως και τη σύνθεση δύο πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων (*primers*) τα οποία οριοθετούν την περιοχή του DNA που πρόκειται να αντιγραφεί/ενισχυθεί. Το κάθε ένα πριμοδοτικό ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία του ενός κλώνου της διπλής έλικας του DNA στα δύο αντίθετα άκρα της επιλεγμένης περιοχής. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει 25-35 κύκλους ενίσχυσης, καθένας εκ των οποίων αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα :

i. Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA (*denaturation*)

Θέρμανση του μίγματος, για τη δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων DNA (μετατροπή διπλής έλικας σε απλή).

ii. Υβριδίωση (*annealing*)

Μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης, ώστε να γίνει δυνατή η σύνδεση των οδηγών πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων στα μόρια του μονόκλωνου DNA, δηλαδή η προσκόλληση των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων στα σημεία έναρξης της αντιγραφής.

iii. Προέκταση (*extension*)

Επιτελείται η αντιγραφή των αλυσίδων DNA με επιμήκυνση των πριμοδοτικών αλληλοδιαδοχών. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται και πάλι αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης, με σκοπό το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση να λάβει την βέλτιστη τιμή ενεργότητας του και η χρονική διάρκεια του σταδίου αυτού εξαρτάται άμεσα από το επιδιωκόμενο μήκος του τελικού προϊόντος σε συνδυασμό με την αποδοτικότητα του ενζύμου. Η αποδοτικότητα της Taq DNA πολυμεράσης ανέρχεται στα 1000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό.

Καθώς η όλη διεργασία επαναλαμβάνεται, τα νεοσυντιθέμενα τμήματα DNA λειτουργούν με τη σειρά τους ως εκμαγεία και μέσα σε λίγους κύκλους το επικρατέστερο DNA είναι παρόμοιο με την αλληλουχία που περιορίζεται από τα δύο ειδικά σχεδιασμένα συνθετικά πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια στο αρχικό εκμαγείο και περιέχει τους δύο πριμοδότες.

Στην παρούσα εργασία με τη βοήθεια της τεχνικής PCR επιτεύχθηκε η ανίχνευση των γεγονότων ρετρομετάθεσης σε γενωμικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας δύο συμπληρωματικούς πριμοδότες προς συγκεκριμένες αλληλουχίες του γονιδίου της EGFP.

Σε σωληνάριο eppendorf προσθέτουμε τα απαραίτητα αντιδραστήρια, που παρατίθενται στον πίνακα 2.1.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)</i>
DNA εκμαγείο	4 (~300 ng)
Πρόσθιος πριμοδότης GFP968 (0.5 μg/ μl) [5' GCACCATCTTCTTCAAGGACGAC-3']	0.5
Ανάστροφος πριμοδότης GFP1013 (0.5 μg/μl) [5'-TCTTTGCTCAGGGCGGACTG-3']	0.5
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (10X) [QIAGEN] [Tris-Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂	5
10 mM Μείγμα dNTPs	1
5U/μl Taq πολυμεράση [QIAGEN]	0.25
Απεσταγμένο H ₂ O	38.75
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	50

Πίνακας 2.1 : Στοιχειομετρία συστατικών μιας τοπικής αντίδρασης PCR.

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων προστίθενται σε κάθε eppendorf 3 σταγόνες παραφινέλαιου, έτσι ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Ακολούθως, τα σωληνάκια τοποθετούνται στο θερμικό μπλοκ, του θερμικού κυκλοποιητή (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler), στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση. Οι συνθήκες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR, παρατίθενται στον πίνακα 2.2. Το προφίλ αυτό πραγματοποιείται για 33 κύκλους.

<u>Denaturation</u>	94°C για 30 sec
<u>Annealing</u>	61°C για 30 sec
<u>Extension</u>	72°C για 2 min

Πίνακας 2.2: Προφίλ αντίδρασης PCR

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση με ποσότητας δείγματος 18 μ l, σε πηκτή αγαρόζης 1.2%, όπως περιγράφεται στην αμέσως επόμενη ενότητα.

2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση προϊόντων DNA της αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.2 % w/v. Στο διάλυμα αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0.4 μ g/ml, ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα ανίχνευση των διαχωρισμένων ζωνών DNA σε ειδική συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Ως φορέας ηλεκτρονίων για τη δημιουργία τάσης χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα TBE [89 mM Tris-HCl, 89 mM βορικό οξύ και 2 mM EDTA].

Για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιούνται 18 μ l από κάθε δείγμα και 2 μ l διαλύματος χρωστικής ουσίας [βρωμοφαινόλη (0.4% w/v), κυανούν ξυλόλης (0.4% w/v) και φικόλη (25% w/v)]. Ως δείκτης των μοριακών μεγεθών των διαχωρισμένων ζωνών χρησιμοποιείται ο pBR322/HinfI, ο οποίος προκύπτει μετά από πλήρη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση HinfI του πλασμιδίου pBR322. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε τάση 40V. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης εκτίθεται σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου το προκύπτον αποτέλεσμα φωτογραφίζεται.

2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA

2.4.1 Real-Time PCR

1 μ g απομονωμένου ολικού RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen) μετατράπηκε σε cDNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του QuantiTect Reverse transcription Kit (Qiagen). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 στο cDNA. Οι αντιδράσεις Real Time PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικών πολυτρυβλίων (PCR multi-plate wells) σύμφωνα με την ακόλουθη σύσταση αντιδραστηρίων: 5 μ l SYBR PCR Master Mix 2 (KAPA Biosystems, Boston, United States), 1 μ l cDNA, 3 μ l d.d.H₂O και 1 μ l primer pair-mix (5 pmol/ μ l, για κάθε εκκινητή). Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν

και χρησιμοποιήθηκε ο κυκλοποιητής CFX96 Real Time System, C1000 Thermal Cyclor (Biorad, London, UK). Οι αντίστοιχοι εκκινητές (Forward & Reverse primer) για το κάθε γονίδιο (gene) που εξετάστηκε αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα 2.3:

Real Time-PCR Primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
Slug	5'-tctgcagacccactctgatg-3'	5'-agcagccagactcctcatgt-3'
Snail	5'-tgagaagccattctcctgct-3'	5'-cttcacatccgagtggttt-3'
Twist	5'-cggacaagctgagcaagatt-3'	5'-gcaggacctgtacaggaag-3'
TGF-β1	5'-tgagtggctgtctttgacg-3'	5'-agccctgtattccgtctcct-3'
Nanog	5'-aagcagaagatgcggactgt-3'	5'-atctgctggaggctgagta-3'
Oct4	5'-ccaatcagcttgggctagag-3'	5'-ctgggaaagggtgcctctga-3'
GAPDH	5'-gcagtggcaaagtggagatt-3'	5'-gaattgccgtgagtgaggt-3'.

Πίνακας 2.3 : Πριμοδότες για τη μέτρηση της έκφρασης mRNA των γονιδίων Slug, Snail, Twist, TGF-β1, Nanog, Oct4 και GAPDH μέσω Real-Time PCR.

2.5 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.5.1 Ανάλυση πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (*Western blotting*)

Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών βάσει της ικανότητας των να συνδέονται σε ειδικά αντισώματα. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος μπορεί να ανιχνευτεί από ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα (κυττάρων, ιστών ή ανασυνδιασμένων *in vitro* πρωτεϊνών), δίνοντας πληροφορίες για το μέγεθος της πρωτεΐνης (εν συγκρίσει με ένα δείκτη μοριακών βαρών σε μονάδες μέτρησης kDa) και επίσης για το ποσοστό έκφρασής της (συγκρινόμενη με το δείγμα του μάρτυρα). Σημαντικό ρόλο στην τεχνική αποτελεί η ποιότητα των αντισωμάτων και ο βαθμός ειδικότητάς των ως προς την πρωτεΐνη που μελετάται.

Τα βήματα που ακολουθούνται για την διεκπεραίωση της ανάλυσης είναι τα ακόλουθα:

1. Παρασκευή εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών

Πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Αρχικά τα κύτταρα αναπτύχθηκαν έως ότου να καταλάβουν όλη την επιφάνεια δύο πλαστικών φιαλών των 75 cm². Ακολούθως θρυψινοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal και φυγοκεντρήθηκαν 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 4 ml PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, όπως προηγουμένως. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε 1ml PBS και μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 400xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 150 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 1 mM PMSF, 1 μg/ml पेπιστατίνης και 1 μg/ml λευπεπτίνης. Ακολούθησε επώαση του εναιωρήματος σε πάγο για 30 λεπτά, με αναδεύσεις ανά 5 λεπτά με τη χρήση Vortex. Κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η λύση των κυττάρων και η εκχύλιση των περισσότερων διαλυτών πρωτεϊνών τους. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 13000xg για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και συντηρείται στους -80°C.

2. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής Bradford, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Το αντιδραστήριο βασίζεται στη χρωστική ουσία coomassie brilliant blue-G250 και η τεχνική στηρίζεται στην μέτρηση της διαφοράς

μεταξύ του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 460nm στα 595 nm, αφού δεσμευθεί σε πρωτεΐνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf προστέθηκαν 795 μl απεσταγμένου νερού, 200 μl αντιδραστηρίου Bio-Rad και 3 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα μείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύτηκαν με χρήση Vortex. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (DU@520, Beckman) στα 595 nm.

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος υπολογίστηκε βάσει της οπτικής πυκνότητας κάθε δείγματος και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης αλβουμίνης βοός (BSA). Η συγκεκριμένη πρότυπη καμπύλη συσχετίζει την οπτική πυκνότητα ενός δείγματος με την πρωτεϊνική συγκέντρωση και έχει εξίσωση:

$y=13.1x-0.21$, όπου y =συγκέντρωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και x =οπτική πυκνότητα δείγματος.

3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες μέσω ηλεκτροφόρησης μιας διάστασης σε πηκτή δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό μέγεθός τους, σε ηλεκτρικό πεδίο. 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 ακρυλαμιδίου.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου που διακρίνονται σε δύο μέρη:

α) την πηκτή επιστοίβαξης (*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

β). Την πηκτή διαχωρισμού (*resolving gel*), με τελική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 10% [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 έγινε 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. Ακολούθως, τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάθετα σε ηλεκτροφορητική συσκευή Biorad υπό τάση 100 Volt και 200mA για περίπου 1 ώρα σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης [25mM (w/v) Tris-HCl, 192mM (w/v) γλυκίνη, 0.1% (v/v) SDS]. Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται SDS, ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τα φορτία των ίδιων των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους, παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος. Το SDS προσδένεται στις πρωτεΐνες, ανά περιοχές μερικών αμινοξέων, και εξουδετερώνει τις διαφορές στα φορτία των πρωτεϊνών, εξασφαλίζοντας ότι οι πρωτεΐνες θα διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος τους και όχι βάσει του φορτίου τους.

4. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η διαδικασία υγρής μεταφοράς (wet transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς [25 mM (w/v) Tris, 192 mM (w/v) γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη]. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και 2 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού χρωματογραφίας (3MM 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) 1 κομμάτι σπόγγου - 1 κομμάτι χαρτιού Whatman - μεμβράνη νιτροκυτταρίνης - πηκτή - 1 κομμάτι χαρτιού Whatman - 1 κομμάτι σπόγγου (αρνητικός πόλος).

Τα κομμάτια τοποθετούνται προσεκτικά απομακρύνοντας τις τυχόν φυσαλίδες, που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ τους και στη συνέχεια η συσκευή γεμίζεται με το διάλυμα μεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ολονύκτια σε σταθερή τάση 35 Volt στους 4°C.

Την επομένη και μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη επώαζεται 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 το ειδικό πρωτοταγές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε σε διάλυμα PBS, παρουσία 3% (w/v) μη λιπαρού γάλακτος, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C. Η χρησιμοποιούμενη αραίωση του αντισώματος στο διάλυμα και το χρονικό διάστημα της επώασης εξαρτώνται από την ικανότητα πρόσδεσης του αντισώματος στην προς εξέταση πρωτεΐνη, την ποσότητα της πρωτεΐνης στο κύτταρο καθώς επίσης και από την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στο εξεταζόμενο εκχύλισμα.

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 προσδένεται 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.

Τέλος, η μεμβράνη αφήνεται να αντιδράσει για 5 λεπτά με τα ειδικά αντιδραστήρια [SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)] της τεχνικής ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και ακολούθως ανιχνεύεται η προς εξέταση πρωτεΐνης σε ειδικό μηχάνημα (biorad).

2.5.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (*Indirect Immunofluorescence*)

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί εργαστηριακή τεχνική, για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό και τη σχετική ποσότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και δεσμεύονται

ειδικά σε μια πρωτεΐνη και ακόλουθη πρόσδεση δεύτερων αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν και δεσμεύονται στα πρώτα. Τα δεύτερα αντισώματα φέρουν μια φθορίζουσα ομάδα που εκπέμπει σε ένα μήκος κύματος, δίνοντας την ικανότητα ανάλυσης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (confocal microscopy) και επακόλουθο εντοπισμό της προς εξέταση πρωτεΐνης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται κατωτέρω:

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται και αφήνονται να αναπτυχθούν πάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 10 mm εντός τρυβλίου διαμέτρου 35 mm. Όταν τα κύτταρα καταλάβουν περίπου το 80-90% της διαθέσιμης επιφάνειας του τρυβλίου πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων με τον ακόλουθο τρόπο. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα, σε κάθε καλυπτρίδα, εκπλένονται τρεις φορές με 1 ml διαλύματος PBS. Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με την προσθήκη 1 ml φορμαδεύδης 3.7% (v/v) για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Ακολούθως τα μονιμοποιημένα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με 1 ml διαλύματος PBS και στη συνέχεια αφήνονται για 10 λεπτά σε διάλυμα 0.5% blocking buffer [0.5% (v/v) Triton X-100, 0.22% (v/v) ζελατίνη δέρματος ιχθύος σε PBS], ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα των μεμβρανών και να διευκολυνθεί η είσοδος των αντισωμάτων στα κύτταρα. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε μια από τις προς εξέταση καλυπτρίδες 15μl από το πρωτοταγές αντίσωμα για μία ώρα, το οποίο θα αναγνωρίσει και θα δεσμευτεί με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Μετά, τα προσκολλημένα στις καλυπτρίδες κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με 1 ml διαλύματος 0,1% blocking buffer [0.1% (v/v) Triton X-100, 0.22% (v/v) ζελατίνη δέρματος ιχθύος σε PBS]. Την τελευταία φορά αφήνεται για 10 λεπτά και ακολούθως οι καλυπτρίδες επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα δεσμεύεται στο πρώτο αντίσωμα και φέρει την φθορίζουσα ομάδα βάσει της οποίας θα ανιχνευθεί η προς εξέταση πρωτεΐνη. Μετά τα πέρας της μίας ώρας πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με 1 ml διαλύματος PBS, εκ των οποίων η τελευταία πλύση αφήνεται για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά με 20 μl RNάση (1:10 σε διάλυμα PBS) και ακολούθως εκπλένονται δύο φορές με PBS. Στη συνέχεια, προκειμένου να σημανθούν οι πυρήνες των κυττάρων προστίθεται 1 ml διαλύματος Propidium Iodine (PI), σε αραιώση 1:2500 σε PBS, για 10 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλένονται πολύ καλά με διάλυμα PBS και οι καλυπτρίδες πάνω στις οποίες βρίσκονται,

μεταφέρονται και τοποθετούνται με τη χρήση διαλύματος επικάθησης και παρεμπόδισης αποχρωματισμού (*antibleach*) σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (*confocal fluorescence microscopy*).

Να σημειωθεί ότι οι αραιώσεις των αντισωμάτων, όπου ήταν απαραίτητο, πραγματοποιούνται σε διάλυμα 0,1% blocking buffer [0.1% (v/v) Triton X-100, 0.22% (v/v) ζελατίνη δέρματος ιχθύος σε PBS]. Στην περίπτωση διπλής σήμανσης έναντι δύο πρωτεϊνών στο ίδιο δείγμα, πραγματοποιείται το ίδιο πρωτόκολλο όπως αναγράφεται παραπάνω για την περίπτωση σήμανσης για μια πρωτεΐνη. Χρησιμοποιούνται αντισώματα που προέρχονται από διαφορετικά ζώα, τα οποία αναμειγνύονται και επωάζονται ως κοκτέιλ (π.χ rabbit anti-A και mouse anti-B). Το ίδιο ισχύει και για τα δεύτερα αντισώματα (π.χ goat anti-rabbit συνδεδεμένο με FITC και goat anti-mouse συνδεδεμένο με Cy-5).

2.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟΥ DNA

2.6.1 Κατασκευή του πλασμιδίου pCDNA3.1/MMTV-RT

Η κατασκευή του πλασμιδίου pCDNA3.1/MMTV-RT βασίστηκε στο πλασμίδιο pUC12N/MMTV-RT (267). Το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού MMTV (MMTV-RT) απομονώθηκε έπειτα από περιοριστική πέψη του πλασμιδίου pUC12N/MMTV-RT, με το ένζυμο NcoI σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας invitrogen (ολονύκτια επώαση, 37°C). Επίσης, στις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε περιοριστική πέψη με το ένζυμο NheI και στον πλασμιδιακό φορέα pCDNA3.1(+), στον οποίο θα κλωνοποιηθεί στη συνέχεια το γονίδιο MMTV-RT.

Ακολούθησε αντίδραση klenow και για τα δύο πλασμίδια στις ακόλουθες συνθήκες:

Αρχικά παρασκευάστηκε το εξής μίγμα: 9μl ddH₂O + 1μl Buffer for Klenow. Από το μίγμα αυτό πήραμε τα 9.5μl και προσθέσαμε 0.5μl Klenow enzyme (5U/μl). Στη συνέχεια υπολογίσαμε τη χρειαζόμενη ποσότητα από το τελικό μίγμα, ανάλογα της συγκέντρωσης του DNA, σύμφωνα με την αναλογία 1μg DNA : 0.1U Klenow enzyme. Η τελική αντίδραση αναγράφεται στο πιο κάτω πίνακα 2.4:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)
DNA (1μg/μl)	10
Buffer for Klenow	10
dNTPs (2,5mM)	8
Klenow enzyme (από μίγμα)	4
ddH ₂ O	68
Τελικός όγκος	100 μl
37°C για 20 min	
75°C για 10 min	

Πίνακας 2.4: Συνθήκες αντίδρασης Klenow

Στην συνέχεια, το DNA των 2 πλασμιδίων καθαρίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του MinElute PCR purification kit (Qiagen) και ακολούθησε περιοριστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII, στους 37°C. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε 0.9% αγαρόζη και καθαρισμός των ζωνών (bands) που μας ενδιαφέρουν από τα δύο πλασμίδια, με τη χρήση ειδικών στήλων (MinElute Gel extraction kit).

Στην πορεία, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης (ligation), σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα :

Αντιδραστήρια	Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)
pCDNA3.1 (+) (vector)	4μl
pUC12N-MMTVRT (insert)	1μl
2x Buffer	10μl
Quick Ligase	1μl
ddH ₂ O	4μl
Τελικός όγκος	20μl

Πίνακας 2.5: Συνθήκες αντίδρασης σύνδεσης

Τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων ως εξής: 100 μl βακτηρίων αποψύχθηκαν από τους

-70 °C σε πάγο και ακολούθως αναμείχθηκαν με 50-100 ng πλασμιδιακού DNA. Το μείγμα ψύχθηκε στον πάγο για 30 λεπτά και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 42 °C για 2 λεπτά (θερμικό σοκ). Στη συνέχεια, προστέθηκε στο μείγμα 1 ml θρεπτικό υλικό LB με επακόλουθη επώαση σε υδατόλουτρο των 37 °C, για 1 ώρα. Ακολούθησε επίστρωση του βακτηριακού εναιωρήματος σε όγκους 50, 100 και 200 μl σε τρυβλία στερεού θρεπτικού υλικού που περιείχε το ανάλογο αντιβιοτικό για την επιλογή των βακτηριακών κλώνων, οι οποίοι έφεραν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο.

Τέλος, οι μετασχηματισμένοι βακτηριακοί κλώνοι απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό που περιέχει το ανάλογο αντιβιοτικό και, μετά την παρασκευή πλασμιδιακού DNA (pCDNA3.1-MMTVRT) από 5 αποικίες σύμφωνα με τις οδηγίες του QIAprep® Miniprep kit (Qiagen), ελέχθηκαν για την εγκυρότητα της κατασκευής με περιοριστική ανάλυση με τα κατάλληλα ένζυμα. Μετά τον έλεγχο, παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου με τη χρήση του HiPure Plasmid MidiPrep Kit (Invitrogen). Το απομονωμένο DNA συντηρείται στους -20°C μέχρι την χρήση του. Το παρασκευασμένο πλασμίδιο pCDNA3.1-MMTVRT χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30 & EPH4-VL30 μέσω λιπιδίων (transfection) (ενότητα 2.2.6).

2.6.2 Κατασκευή πλασμιδίου pLKO-Puro/PSF (shRNA)

Για την κατασκευή του πλασμιδίου shRNA pLKO-Puro/PDF χρησιμοποιήσαμε ειδικά σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια [πρόσθιο ολιγονουκλεοτίδιο (Forward oligo): 5'-CCGG- **GCAAAGGGTTCGGGTTCATTA** -CTCGAG-**TAATGAACCCGAACCCTTTGC**-TTTTTG-3', ανάστροφο ολιγονουκλεοτίδιο (Reverse oligo): 5'-AATTCAAAAA- **GCAAAGGGTTCGGGTTCATTA**-CTCGAG-**TAATGAACCCGAACCCTTTGC**-3']. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα 2.6:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)
Πρόσθιο ολιγονουκλεοτίδιο (F oligo), 1μg/μl 5'-CCGG-GCAAAGGGTTCGGGTTCATTA-CTCGAG- TAATGAACCCGAACCCTTTGC-TTTTTG-3'	5μl
Ανάστροφο ολιγονουκλεοτίδια (R oligo), 1μg/μl 5'-AATTCAAAAA-GCAAAGGGTTCGGGTTCATTA- CTCGAG- TAATGAACCCGAACCCTTTGC-3'	5μl
NE buffer 2 10x	5μl
ddH ₂ O	35μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	50μl

Πίνακας 2.6

Στη συνέχεια η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον κυκλοποιητή για PCR, με τις ακόλουθες συνθήκες: 95°C για 4 min και 70°C για 10 sec. Έπειτα τα δείγματα αφήνονται για 3 h σε δοχείο, το οποίο περιέχει νερό στους 70 °C, μέχρις ότου πάρουν θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθως, το προϊόν της αντίδρασης από το στάδιο 2 κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pLKO-Puro, έπειτα από πέψη του με τα ένζυμα AgeI/EcoRI. Η αντίδραση σύνδεσης (ligation) για την τελική κατασκευή του πλασμιδίου shRNA pLKO-Puro/PDF πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min, όπως αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα 2.7.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)
pLKO AgeI/EcoRI (IP purified 11ng/μl)	4μl
Ολιγονουκλεοτίδιο shRNA-PSF	1μl
2x Buffer	10μl
Quick Ligase	1μl
ddH ₂ O	4μl
Τελικός όγκος	20μl

Πίνακας 2.7

Τέλος για την διαμόλυνση των κυττάρων HC11 με το πλασμίδιο pLKO-Puro/PSF ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.6.

2.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια γρήγορη, ποσοτική και πολυπαραμετρική τεχνική, που βασίζεται στην ανάλυση κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει την μικροσκοπική ανάλυση κυττάρων με χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών. Για την μέτρηση των δειγμάτων, απαιτείται τα δείγματα να βρίσκονται υπό μορφή εναιωρήματος. Τα κύτταρα εστιάζονται υδροδυναμικά σε μια κεντρική ροή και εισέρχονται ένα-ένα από την κυψελίδα ροής και συνεπώς δέχονται την προσπίπτουσα ακτινοβολία (laser). Κατά την ανάλυση των δειγμάτων οι φυσικές παράμετροι που αξιοποιούνται είναι η σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και η παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία. Η ακτινοβολία που συνήθως προέρχεται από ένα laser, ως πηγή ενέργειας είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών, η οποία μετράται από το κυτταρόμετρο ροής ως εκπομπή φθορισμού (*Fluorescence Emission*) και καθορίζει την ένταση φθορισμού των κυττάρων. Ταυτόχρονα όμως καθώς προσπίπτει πάνω στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Η σκέδαση των κυττάρων εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, δίνοντας την δυνατότητα στο κυτταρόμετρο ροής να διαχωρίζει τον κυτταρικό πληθυσμό ενός δείγματος 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.

Ο συνδυασμός σκεδασμού και φθορισμού του φωτός αναλύεται από διάφορους ανιχνευτές. Η ανάλυση διακυμάνσεων φωτεινότητας σε κάθε ανιχνευτή είναι δυνατόν να δώσει διάφορους τύπους πληροφοριών για τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου μορίου. Επιπλέον μέσω λογισμικού μπορεί να απομονωθεί ηλεκτρονικά ο πληθυσμός ενδιαφέροντος εφαρμόζοντας γύρω από αυτόν μια περίφραξη (*gate*).

2.7.1 Μέτρηση ποσοστού ρετρομετάθεσης μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS)

Η ικανότητα της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής να μετρά την ένταση φθορισμού ενός κυτταρικού δείγματος, μας έδωσε την δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε τα γεγονότα ρετρομετάθεσης ανά κυτταρικό δείγμα στα

διαμολυσμένα με το ανασυνδιασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο VL30, αφού το τελευταίο είναι σημασμένο με την ειδική κασέτα ανίχνευσης EGFP.

Η πειραματική πορεία ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της κυτταρομετρίας ροής έχει ως εξής: οι προς εξέταση κλώνοι, μετά από επιλογή με το κατάλληλο αντιβιοτικό, αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας απουσία του αντιβιοτικού για 3 ημέρες. Ακολούθως, τα προς μελέτη κύτταρα καθώς και τα κύτταρα-μάρτυρες HC11, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού RPMI και φυγοκεντρώνται 1500xg 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 5 ml (Becton Dickinson), προκειμένου να αναλυθούν στο κυτταρόμετρο ροής. Τα κύτταρα HC11 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 τις τιμές αυτές 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.

2.7.2 Ανίχνευση επιφανειακών δεικτών μέσω άμεσου ανοσοφθορισμού των και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής

Αρχικά τα κύτταρα μάρτυρες HC11 και οι προς μελέτη διαμολυσμένοι κλώνοι θρυψινοποιούνται. Με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου Neubauer, μετρούνται 2×10^6 κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 5 ml θρεπτικού υλικού RPMI και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1.500xg και στη συνέχεια αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα εκπλένονται με 5 ml PBS.

Έπεται φυγοκέντρηση, όπως και προηγουμένως και το προκύπτον ίζημα επαναιωρείται σε 5 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 4 σωληνάρια πολυστυρενίου των 5 ml (Becton Dickinson), ώστε σε κάθε ένα να προκύπτουν 0.5×10^6 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 μ l διαλύματος cell staining buffer. Σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας, ποσότητα $<0.2 \mu$ g αντισώματος είναι αρκετή για σήμανση 10^6 κυττάρων σε τελικό όγκο 100 μ l. Χρησιμοποιήσαμε 0.5 μ l αντισώματος, που αντιστοιχεί σε 0.1 μ g ανά 0.5×10^6 κύτταρα σε τελικό όγκο 100 μ l. 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 cell staining buffer και επακόλουθη 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 μ l διαλύματος cell staining buffer και τα δείγματα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.

2.8 In vivo ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

2.8.1 In vivo εξέταση δυνατότητας καρκινογένεσης θετικών ρετρομετάθεσης HC11-VL30 και HC11-L1 σε ποντίκια Balb/C.

Δημιουργήσαμε 3 ομάδες ποντικών Balb/C, αποτελούμενες από 7 ποντίκια έκαστη και εφαρμόσαμε δύο πειραματικές προσεγγίσεις, σύμφωνα με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν ενέσεις **α.** 1×10^6 κυττάρων και **β.** 5×10^6 θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων μαζικών κλώνων HC11-VL30 (ομάδα Α) ή HC11-L1 (ομάδα Β) ή κανονικών κυττάρων μαρτύρων HC11 (ομάδα Γ). Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν στην κοιλιακή χώρα των ποντικών δίπλα στον λιπώδη ιστό των μαστικών αδένων. Τα ποντίκια εξετάζονταν με ψηλάφηση στο σημείο της ένεσης κάθε 3 ημέρες για την ανίχνευση ανάπτυξης όγκων, για διάστημα 3 μηνών.

2.8.2 Απομόνωση κυττάρων από ιστούς-νεοπλάσματα

Ένα τμήμα από κάθε απομονωμένο ιστό όγκων μεταφέρθηκε σε τρυβλίο petri και ξεπλύθηκε με 10 ml PBS. Ακολούθως ο ιστός τεμαχίστηκε και επώαστηκε για 1 ώρα στους 37 °C σε διάλυμα κολλαγενάσης (1.5 mg/ml Collagenase P σε διάλυμα HBSS, το οποίο περιέχει 10 mM HEPES). Τα συσσωματώματα καρκινικών κυττάρων διασπάστηκαν περαιτέρω σε μονήρη κύτταρα με διάλυμα τρυψίνης για 10 λεπτά. Τα μονήρη πλέον κύτταρα αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 περιέχον 2 mM L-γλουταμίνη, 10% κατ' όγκο εμβρυϊκός ορός βοός (FCS), 10 ng/ml ινσουλίνη, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) και 100 U αμπικιλίνη/100 μg στρεπτομυκίνη.

2.8.3 Σκλήνωση ιστών και τομές παραφίνης

Για να μπορέσουμε να πάρουμε μια λεπτή τομή με τη χρήση μικροτόμου, οι ιστοί θα πρέπει μετά τη μονιμοποίηση να διηθηθούν με μια ουσία που θα δώσει μια σταθερή συνοχή, απαραίτητη για τομή. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με τον εμποτισμό του ιστού σε παραφίνη, αλλά και σε άλλες ουσίες όπως ζελατίνη, κυτταρίνη, παραφίνες ή άλλα πλαστικά υλικά. Οι εμποτισμένοι στην παραφίνη ιστοί μπορούν να κοπούν σε πάχος 3 – 10 μ (συνήθως 6 – 8 μ) και στη συνέχεια να παρατηρηθούν σε οπτικό μικροσκόπιο.

Στην επεξεργασία του ιστού πριν την σκλήνωση (εμποτισμό) προηγούνται 2 κύριες φάσεις: η αφυδάτωση και η διαύγαση (καθάρισμα). Ο υγρός μονιμοποιημένος ιστός δεν μπορεί να επεξεργαστεί κατευθείαν με παραφίνη, αν δεν αφαιρεθεί πρώτα το νερό. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικά βαπτίσματα σε βαθμιαίες σειρές από μίγματα αιθανόλης. Μετά η αιθανόλη αντικαθίσταται από ουσίες που διαλύουν το λίπος. Καθώς οι ιστοί εμποτίζονται με το διαλυτικό γίνονται συνήθως διαφανείς και για αυτό το λόγο η φάση αυτή καλείται διαύγαση ή καθαρίσμα. Στη σκλήνωση με παραφίνη το σύνηθες διαλυτικό που χρησιμοποιείται είναι η ξυλόλη (xylene) ή το τολουόλιο (toluene).

Όταν ο ιστός εμποτισθεί με το διαλυτικό τοποθετείται στη συνέχεια σε λιωμένη παραφίνη (58 - 60 °C). Η θερμότητα έχει σαν αποτέλεσμα να εξατμίζεται το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίζουν με παραφίνη. Αυτή είναι η διεργασία του εμποτισμού ή σκλήνωσης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σκλήνωση και τομές παραφίνης των νεοπλασμάτων ήταν η εξής:

Οι ιστοί (νεοπλάσματα) μονιμοποιήθηκαν ολονύχτια με διάλυμα 4% παραφορμαδεΰδης σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολούθησαν 2 πλύσεις των 30 λεπτών με PBS και στη συνέχεια οι ιστοί εμβαπτίζονται σε μια σειρά διαλυμάτων με σκοπό να γίνει αφυδάτωση του ιστού: 50% αιθανόλης/PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, δύο αλλαγές με διάλυμα 70% αιθανόλης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και με τα εξής διαλύματα για 30 λεπτά: 85% αιθανόλη, 95% αιθανόλη, 100% αιθανόλη (2 φορές), τολουόλιο (2 φορές). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε εμποτισμός των ιστών σε παραφίνη σε θερμοκρασία 60 °C για 20 λεπτά (3 φορές). Τα μικρά κομμάτια της παραφίνης που περιέχουν τους ιστούς κόπηκαν στη συνέχεια με ατσάλινη λεπίδα μικροτόμου σε πάχος 5 μm. Αφού ετοιμάστηκαν οι τομές, τοποθετήθηκαν σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πάνω σε σταγόνες νερού και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο (45-50 °C) για περίπου 2 ώρες, έτσι ώστε να υποβοηθηθεί η προσκόλληση της τομής.

2.8.4 Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης σε τομές παραφίνης/ κρυστάτη

Με λίγες εξαιρέσεις οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι, γεγονός που δυσκολεύει τη μικροσκοπική τους παρατήρηση. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για τη χρώση των ιστών, που επιτρέπουν τόσο τη παρατήρηση των επιμέρους συστατικών του ιστού, αλλά και τη διάκριση μεταξύ τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιγμάτων χρωστικών που έχουν τη τάση να χρωματίζουν τα στοιχεία του ιστού περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά. Οι περισσότερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν βασικές ή όξινες ενώσεις και έχουν τη τάση να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών. Από όλες τις χρωστικές, ο συνδυασμός της αιματοξυλίνης και εωσίνης είναι αυτός που χρησιμοποιείται πιο συχνά.

Για την απόπαραφίνωση και χρώση των τομών ακολουθήσαμε την ακόλουθη διαδικασία: οι εγκλωβισμένοι στη παραφίνη ιστοί εμβαπτίζονται σε μια σειρά διαλυμάτων: ξυλόλη για 10 λεπτά (2 φορές), 100% μεθανόλη για 2 λεπτά, 75% μεθανόλη/ddH₂O για 2 λεπτά, 30% μεθανόλη/ddH₂O για 2 λεπτά, ddH₂O για 2.5 λεπτά (2 φορές). Στη συνέχεια τα δείγματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 5 λεπτά και ξεπλένονται καλά με νερό βρύσης. Ακολούθησε η εμβάπτιση των δειγμάτων στα ακόλουθα διαλύματα: διάλυμα 0.5% Εωζίνης για 4 λεπτά, ddH₂O για 30 δευτερόλεπτα, 30% μεθανόλη/ddH₂O για 10 sec, 70% μεθανόλη/ddH₂O για 10 sec,

100% μεθανόλη για 1 λεπτό και ξυλόλη για 10 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με χρήση ειδικής κόλας και αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 42 °C.

2.8.5 Ανοσοιστοχημεία σε τομές παραφίνης

Αρχικά τοποθετήσαμε τις αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές στους 60 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά, έτσι ώστε να λιώσει η παραφίνη. Στη συνέχεια οι πλάκες εμβαπτίστηκαν στα παρακάτω διαλύματα για συγκεκριμένο κάθε φορά χρόνο: Για την αποπαραφίνωση οι εγκλωβισμένοι στη παραφίνη ιστοί εμβαπτίζονται σε ξυλόλη για 20 λεπτά (2 φορές), ακολουθήθηκε ενυδάτωση των ιστών εμβαπτίζοντας τις τομές στα ακόλουθα διαλύματα για 5 λεπτά: 100 % αιθανόλη, 96 % αιθανόλη, 80 % αιθανόλη, 60% αιθανόλη και στη συνέχεια ξεπλύναμε τις τομές με ddH₂O για 3 λεπτά. Στην πορεία, με σκοπό να αυξήσουμε την αντιγονικότητα του ιστού οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα κιτρικού ρυθμιστικού διαλύματος pH6 και 95-100 °C (χρήση φούρνο μικροκυμάτων) και αφέθηκαν για 40 λεπτά έως ότου η θερμοκρασία διαλύματος φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με διάλυμα PBS, επώαση των τομών με διάλυμα 1% H₂O₂/ 0.1% Tween/ 1X PBS για 30 λεπτά σε σκοτεινό μέρος (δέσμευση ενδογενούς υπεροξειδάσης) και ξέπλυμα 2 φορές με PBS. Επόμενο βήμα αποτέλεσε το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης αντισώματος με serum blocking Buffer (3% BSA) για 30 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και ολονύχτια επώαση με το πρώτο αντίσωμα (mouse anti-mouse Pan-ceratin) σε σκοτεινό μέρος στους 4 °C. Την επόμενη ημέρα, οι τομές ξεπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν με το σύμπλεγμα HRP (mouse anti-mouse) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από 2 πλύσεις με PBS ακολούθησε η χρώση των τομών με διάλυμα DAB για 30 sec, ξέπλυμα με ddH₂O, χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης για 3 λεπτά, ξέπλυμα με νερό βρύσης και τέλος αφυδάτωση των τομών με τα ακόλουθα διαλύματα για 5 λεπτά: 60 % αιθανόλη, 80 % αιθανόλη, 96 % αιθανόλη, 100% αιθανόλη. Τα δείγματα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με χρήση ειδικής κόλας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν ενδογενείς αλληλουχίες DNA, ικανές να μετατίθενται σε νέες θέσεις στο γένωμα, μέσω ενός ενδιάμεσου ρετροτρανσποζονιακού RNA. Η ρετρομετάθεση αποτελεί σημαντικό μεταλλαξιγόνο παράγοντα, όμως η άμεση επίπτωσή της στην καρκινογένεση δεν είναι γνωστή. Γνωρίζοντας την μεταλλαξιγόνα δράση των ρετροτρανσποζονίων, εξετάσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στη ρετρομετάθεση και στην επαγωγή μετασχηματισμού επιθηλιακών κυττάρων μαστού ποντικού. Στόχοι της πρώτης ενότητας ήταν να διερευνηθούν οι επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης σε κύτταρα μαστού ποντικού με δύο προσεγγίσεις: **α.** η γενικότητα παραγωγής ρετρομεταθέσεων VL30 σε προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού HC11 και στις διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές μαστού ποντικού EPH4, και C127 και **β.** η ειδικότητα παραγωγής ρετρομεταθέσεων από διαφορετικά ρετροτρανσποζόνια στα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού HC11.

3.1.1 Τα επιθηλιακά κύτταρα μαστού παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης

Ως πρώτο βήμα της μελέτης μας, προκειμένου να εξεταστούν οι επιπτώσεις που θα μπορούσαν να έχουν τα γεγονότα ρετρομετάθεσης σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού ακολουθήσαμε τις ακόλουθες προσεγγίσεις:

1. Σε ένα πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με το ανασυνδιασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο VL30, pNVL-3*/EGFP-INT, σε τρεις κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων μαστού ποντικού: **α.** τη κυτταρική σειρά HC11 που χαρακτηρίζεται από προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, συγκριτικά με **β.** τη διαφοροποιημένη σειρά μαστού ποντικού EPH4 & **γ.** την καρκινική σειρά C127.

2. Σε ένα δεύτερο στάδιο με σκοπό να μελετήσουμε τις επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης τριών διαφορετικών ρετροτρανσποζονίων στα προγονικά κύτταρα μαστού HC11, πραγματοποιήθηκαν διαμολύνσεις των κυττάρων HC11, ξεχωριστά, με τα ρετροτρανσποζόνια VL30, LINE-1 και του ρετροϊού MoMLV ως ρετροτρανσποζόνιο,

(DO.MT). Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα HC11 αποτελούν μια αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά μαστού ποντικού με ιδιότητες προγονικών και βλαστικών κυττάρων μαστού.

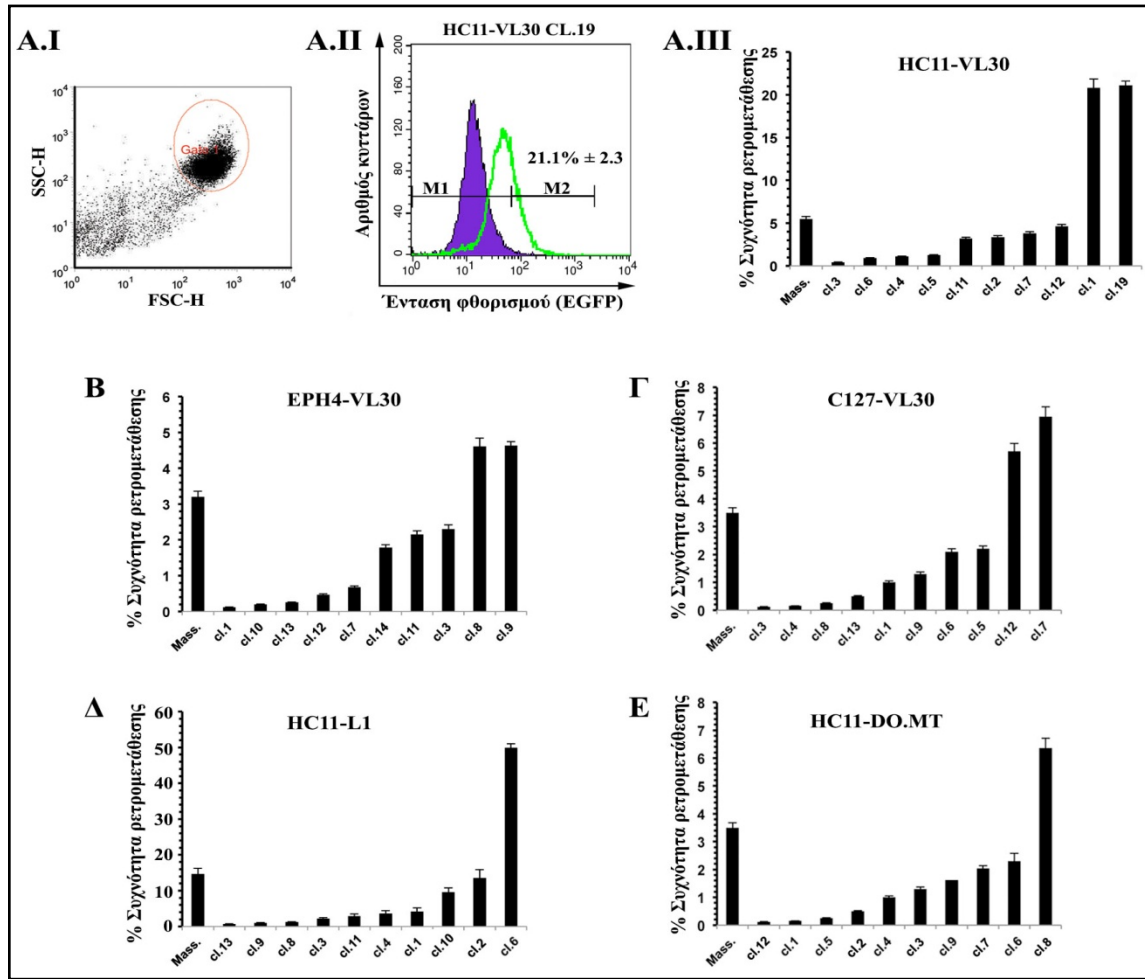
Για τις διαμολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ανασυνδυασμένες πλασμιδιακές κατασκευές: **α.** του ποντικίσιου ρετροτρανσποζονίου VL30, pNVL-3*/EGFP-INT (κατασκευασμένη από το εργαστήριο μας) **β.** του ρετροϊού MoMLV (ως ρετροτρανσποζόνιο), pDO.MT/gpt-EGFP-INT (κατασκευασμένη από το εργαστήριο μας αλλά αδημοσίευτη) και **γ.** του ανθρώπινου ρετροτρανσποζονίου LINE-1, 99-RPS-EGFP/INT (προσφορά Kazazian HH, PA, USA). Σημειώτέον, οι 3 ρετροτρανσποζονιακές κατασκευές είναι σημασμένες με την κασέττα ρετρομετάθεσης EGFP-INT και εκφράζουν πανομοιότυπα την πράσινη φθορισμογόνο πρωτεΐνη EGFP μετά την παραγωγή ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1. Αναφορικά με τις ρετροτρανσποζονιακές κατασκευές: η πρώτη φέρει το γονίδιο της υγρομυκίνης, η δεύτερη το γονίδιο της πουρομυκίνης (puro) και η τρίτη το γονίδιο της φωσφοριβοσυλικής τρανσφεράσης γουανίνης-ξανθίνης (gpt), για λήψη σταθερών κλώνων μετά από ανάλογη κυτταρική επιλογή.

Αρχικά, σε ένα πρώτο πείραμα, μετά το πέρας 48 ωρών από την διαμόλυνση κυττάρων HC11 ή EPH4 ή C127, τα διαμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (FACS) για πιθανή ανίχνευση και μέτρηση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω έκφρασης της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Αν και δεν αναμενόταν, παρατηρήθηκε παραγωγή γεγονότων ρετρομετάθεσης σε όλες τις περιπτώσεις διαμολύνσεων που πραγματοποιήθηκαν. σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (HC11, EPH4, C127), δηλαδή κύτταρα που δεν είχαν διαμολυνθεί με το ανασυνδιασμένο στοιχείο. Τα μετρηθέντα ποσοστά κυμάνθηκαν από 0.13-0.78%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για κάθε διαμόλυνση αναγράφονται στον πίνακα 3.1 (Πίνακας 3.1Α).

ΠΟΣΟΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΣΕ EGFP			
ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΕΙΣ	48 ώρες μετά τη διαμόλυνση	Μονήρεις κλώνοι	Μαζικοί κλώνοι
A. EPH4-VL30	0.18%	0.2-4.6%	3.2%
C127-VL30	0.13%	0.2-7%	3.5%
HC11-VL30	0.78%	0.5-21%	5.48%
HC11-DO.MT	0.3%	0.3-6.8%	3.3%
HC11-L1	0.78%	0.5-50%	13.52%
B. HC11-EGFP	1.89%	-	-
C127-EGFP	14.46%	-	-
EPH4-EGFP	2.18%	-	-

Πίνακας 3.1: *A. Ποσοστά ρετρομετάθεσης θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων EPH4-VL30 και C127-VL30 , συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες EPH4 & C127 και HC11-VL30, HC11-DO.MT και HC11-L1 συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες HC11. B. Αναγράφεται το εκατοστιαίο ποσοστό του αριθμού των EGFP-θετικών κυττάρων που διαμολύνθηκαν μόνο με το πλασμίδιο pEGFP-N1), 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, ως μετρήσιμη ποσότητα αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης*

Σε ένα επόμενο στάδιο προκειμένου να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα των διαμολύνσεων (transfection efficiency) πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών HC11, C127 και EPH4 με το πλασμίδιο pEGFP-N1 και μετρήθηκε το κυτταρικό ποσοστό έκφρασης της EGFP πρωτεΐνης με FACS, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Παρατηρήθηκε αύξηση του κυτταρικού ποσοστού EGFP στα διαμολυσμένα κύτταρα HC11-EGFP, C127-EGFP και EPH4-EGFP συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα-μάρτυρες, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.B, υποδηλώνοντας την αποτελεσματικότητα των διαμολύνσεων.



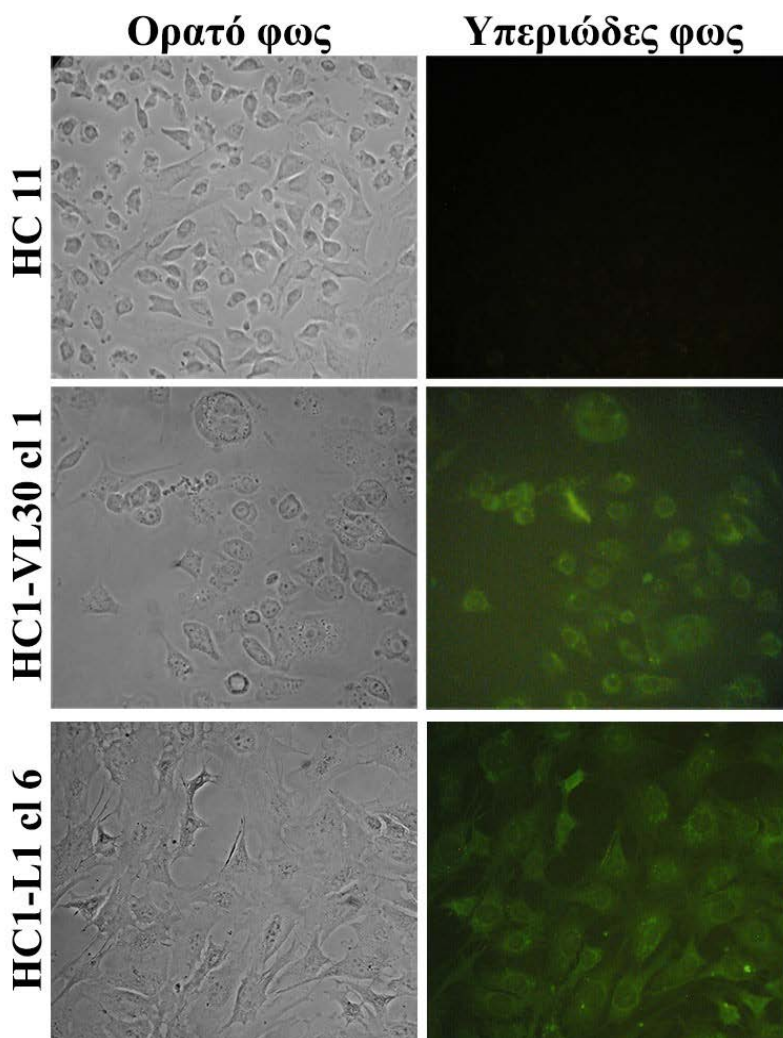
Εικόνα 3.1: Τα επιθηλιακά κύτταρα μαστού παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον ρετρομετάθεσης. Παρουσιάζονται οι συχνότητες ρετρομετάθεσης σε απομονωμένους μαζικούς (Mass.) και μονήρεις κλώνους για κάθε περίπτωση διαμόλυνσης. Κύτταρα HC11 ή EPH4 ή C127 διαμολύνθηκαν με 2.5 μg πλασμιδίου pNVL-3*/EGFP-INT (VL30) ή 99-RPS-EGFP/INT (LINE-1) ή pDO.MT/gpt-EGFP-INT (DO.MT) και τα διαμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με FACS χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μη διαμολυσμένα κύτταρα. **A.I:** Ο πληθυσμός ενδιαφέροντος απομονώνεται ηλεκτρονικά, στα κύτταρα-μάρτυρες HC11 ή EPH4 ή C127 με περίφραξη (gating). **A.II:** Παράδειγμα ιστογράμματος φθορισμού, έπειτα από επικάλυψη κατανομών φθορισμού (overlay) κυττάρων-μάρτυρα HC11, (μωβ χρώμα) και διαμολυσμένων κυττάρων HC11-VL30 (πράσινο χρώμα). M1, M2: κατώφλια έντασης φθορισμού αρνητικών και EGFP-θετικών κυττάρων, αντίστοιχα. Τα κατώφλια ορίζονται βάσει της κατανομής έντασης φθορισμού του μάρτυρα, ώστε το 99.60% των κυττάρων να λαμβάνονται ως αρνητικά και το 0.40% ως λανθασμένα θετικά. Το καθαρό ποσοστό των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων υπολογίζεται αφαιρώντας από το ποσοστό αυτών, το ποσοστό των λανθασμένα θετικών κυττάρων (0.40%). **A.III, B, Γ, Δ, E:** % Ποσοστά ρετρομετάθεσης για μαζικούς και μονήρεις κλώνους HC11/VL30, EPH4-VL30 C127/VL30, HC11/L1 και HC11/DO.MT.

Για επιβεβαίωση της παραγωγής ρετρομετάθεσεων ανά περίπτωση διαμόλυνσης, το πείραμα πραγματοποιήθηκε για δεύτερη φορά με σκοπό την απομόνωση θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων. Η επιλογή των κυττάρων που είχαν επιτυχώς διαμολυνθεί και ενσωματώσει το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, επιτεύχθηκε χορηγώντας στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης το αντίστοιχο αντιβιοτικό-μέσο επιλογής, για 9-18 ημέρες ανάλογα με την κάθε ρετροτρανσποζονιακή κατασκευή (βλ. ενότητα 2.2.6). Η ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό/μέσο επιλογής αποτελεί δείκτη κυτταρικής πρόσληψης του ανασυνδιασμένου στοιχείου, βάσει του γονιδίου ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου. Απομονώθηκαν συνολικά 20 ανθεκτικοί μονήρεις κλώνοι καθώς και μαζικοί πληθυσμοί ~80 κλώνων ανά περίπτωση διαμόλυνσης και ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε κανονικό θρεπτικό μέσο απουσία του αντιβιοτικού/μέσου επιλογής. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ποσοστού ρετρομετάθεσης με κυτταρομετρία ροής (FACS), όπως παραπάνω, για κάθε κλώνο ξεχωριστά καθώς και για τους μαζικούς κλώνους. Παρατηρήθηκε μια ποικιλία στο ποσοστό ρετρομετάθεσης στους κλώνους που απομονώθηκαν ανά περίπτωση (Πίνακας 3.1 και Εικόνα 3.1).

Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν τα ακόλουθα: **α.** οι κυτταρικές σειρές μαστού παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον επαγωγής ρετρομεταθέσεων. Δεν παρατηρήθηκε ρετροτρανσποζονιακή ειδικότητα ρετρομεταθέσεων στα προγονικά κύτταρα μαστού HC11 αλλά ούτε ειδικότητα ρετρομεταθέσεων VL30 σε κυτταρικές σειρές μαστού, παρά μόνο συγκρίσιμες διαφορές μεταξύ των συχνοτήτων ρετρομεταθέσεων ανά ρετροτρανσποζόνιο και κυτταρική σειρά. **β.** Τα ρετροτρανσποζόνια VL30 παράγουν πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ρετρομεταθέσεων στα κύτταρα HC11 απ' ότι στις άλλες κυτταρικές σειρές C127 και EPH4 (Πίνακας 3.1 & Εικόνα 3.1). **γ.** Τα ρετροτρανσποζόνια VL30 και LINE-1 (L1) παράγουν υψηλότερα ποσοστά ρετρομετάθεσης, συγκριτικά με το ρετροϊό MoMLV (DO.MT), σε κύτταρα HC11 (Πίνακας 3.1 & Εικόνα 3.1)

3.1.2 Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε κύτταρα κλώνων

Επόμενο βήμα της μελέτης μας, αποτέλεσε η επιβεβαίωση των γεγονότων ρετρομετάθεσης, στα διαμολυσμένα κύτταρα HC11-VL30, HC11-L1, HC11-DO.MT, EPH4-VL30 και C127-VL30.



Εικόνα 3.2: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30 και LINE σε κύτταρα απομονωμένων κλώνων HC11. Κύτταρα HC11, HC11-VL30 cl.1 και HC11-L1 cl.6 μονιμοποιήθηκαν με παραφορμαλδεΐδη και φωτογραφήθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού στο ορατό και το υπεριώδες φως (μεγέθυνση 40X). Η ανίχνευση EGFP-θετικών κυττάρων υποδηλώνει γεγονότα ρετρομετάθεσης.

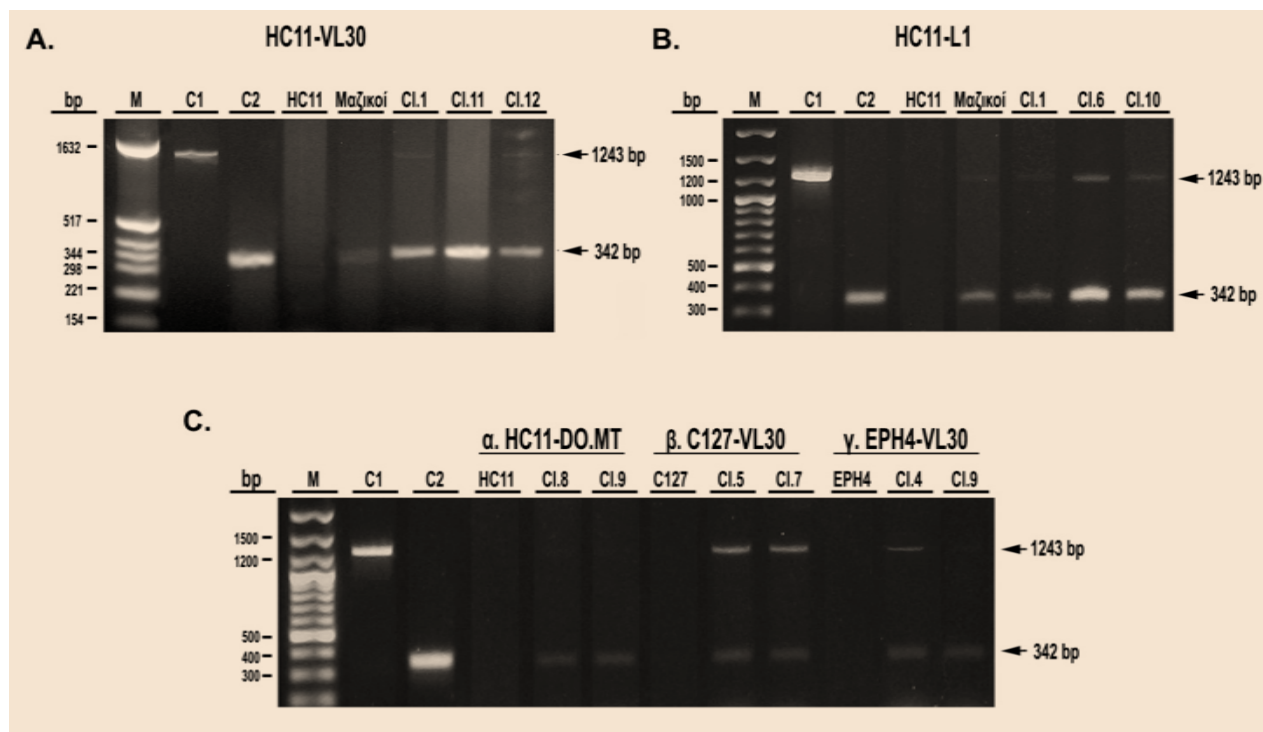
Για το σκοπό αυτό, κατά πρώτον, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση κυττάρων τόσο HC11 ή EPH4 ή C127 ως μάρτυρα, όσο και διαμολυσμένων, με τα ανασυνδιασμένα στοιχεία VL30 (HC11-VL30, EPH4-VL30, C127-VL30) του ρετροϊού MoMLV (ως

ρετροτρανσποζόνιο), (HC11-DO.MT) και του ανθρώπινου ρετροτρανσποζονίου LINE-1 (HC11-L1). Τα δείγματα εξετάστηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού. Η ανίχνευση των ρετρομεταθέσεων βασίστηκε στο φθορίζον πράσινο χρώμα των EGFP-θετικών κυττάρων, που αντιστοιχούσε στα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα κατά την ανάλυση με FACS. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2, παρατηρήθηκε έκφραση της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP στα κύτταρα του κλώνου HC11-VL30 c1.1 και HC11-L1 c1.6, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες HC11. Επιπλέον, η EGFP εντοπίστηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα που συμφωνεί με την έκφρασή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Παρόμοια έκφραση της πρωτεΐνης EGFP ανιχνεύθηκε και σε κύτταρα HC11-DO.MT, EPH4-VL30 και C127-VL30 (αποτελέσματα μη παρουσιαζόμενα).

Κατά δεύτερον, για να τεκμηριώσουμε περαιτέρω ότι η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης, που παρατηρήθηκε τόσο μέσω της μέτρησης φθορισμού της EGFP με κυτταρομετρία ροής όσο και οπτικά με μικροσκοπία φθορισμού, οφείλεται στην επιτυχημένη ενσωμάτωση νέων αντιγράφων του ανασυνδυασμένου VL30 ή LINE-1 ή DO.MT στο γένωμα, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) τόσο στους απομονωμένους μονήρεις όσο και στους μαζικούς κλώνους, για όλες τις περιπτώσεις διαμόλυνσεων. Η ανάλυση PCR πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα DNA τόσο από κύτταρα-μάρτυρες HC11 ή EPH4 ή C127 όσο και από απομονωμένους κλώνους χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές, που οριοθετούν το γονίδιο της EGFP με και χωρίς το ιντρόνιο της γ -σφαιρίνης. Στην περίπτωση των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων αναμέναμε την ανίχνευση δύο προϊόντων: α) το προϊόν των 1243 bp, που αντιστοιχεί στο μη ματισμένο στοιχείο VL30 ή DO.MT ή LINE-1 των αρχικών πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση των κυττάρων pNVL-3*/EGFP-INT, pDO.MT/gpt-EGFP-INT ή 99-RPS-EGFP/INT και β) το προϊόν των 342 bp, που αντιστοιχεί στο ματισμένο μεταγράφημα, μετά από απομάκρυνση του ιντρονίου της γ -σφαιρίνης και είναι διαγνωστικό για γεγονότα ρετρομετάθεσης. Πράγματι, ανιχνεύθηκαν τα δύο προϊόντα των 1243- και 342 bp, στους μονήρεις και μαζικούς κλώνους κυττάρων HC11-VL30, HC11-L1 (Εικόνα 3.3A και B) καθώς και σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους HC11-DO.MT, C127-VL30 και EPH4-VL30 (Εικόνα 3.3C)

που προέκυψαν από τις ανωτέρω διαμολύνσεις. Αντίθετα στα κύτταρα μάρτυρες HC11 ή EPH4 ή C127, όπως αναμενόταν, δεν ανιχνεύθηκε κανένα προϊόν (Εικόνα 3.3).

Τα αποτελέσματα αυτά συνολικά επιβεβαιώνουν: α. την επιτυχή ενσωμάτωση του αρχικού πλασμιδίου και β. την ύπαρξη γεγονότων ρετρομετάθεσης στο γένωμα, μετά την διαμόλυνση κυττάρων HC11 ή EPH4 ή C127 με τις αναδυνδιασμένες ρετροτρανσποζονιακές κατασκευές.



Εικόνα 3.3: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30, LINE και DO.MT. Τα γεγονότα ρετρομετάθεσης επιβεβαιώθηκαν σε γενωμικό επίπεδο με PCR. Στην περίπτωση των διαμολυσμένων κυττάρων HC11-VL30 (A) και HC11-L1 (B), HC11-DO.MT (C.α), C127-VL30 (C.β) και EPH4-VL30 (C.γ), ανιχνεύθηκαν τα προϊόντα των 1243 και 342 bp. Η ζώνη 1243 bp αντιπροσωπεύει το αρχικό μη ματισμένο πλασμίδιο, ενώ η 342 bp είναι διαγνωστική για γεγονότα ρετρομετάθεσης. Τα κύτταρα μάρτυρες HC11 (A, B, C.α), C127 (C.β) και EPH4 (C.γ) δεν εμφάνισαν καμία ζώνη όπως και αναμένετο. M: μάρτυρας μοριακού μήκους pBR322/HinfI (A) και GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (B,C), C1: πλασμίδιο-μάρτυρας pNVL-3*/EGFP-INT (B.II) ή 99-RPS-EGFP/INT ή pDO.MT/gpt-EGFP-INT (DO.MT) ως προς την ζώνη των 1243 bp, που περιέχει το ανασυνδιασμένο γονίδιο EGFP μαζί με το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης, C2: πλασμίδιο-μάρτυρας pEGFP-N1, ως προς τη ζώνη 342 bp, που περιέχει την EGFP χωρίς το ιντρόνιο γ-σφαιρίνης.

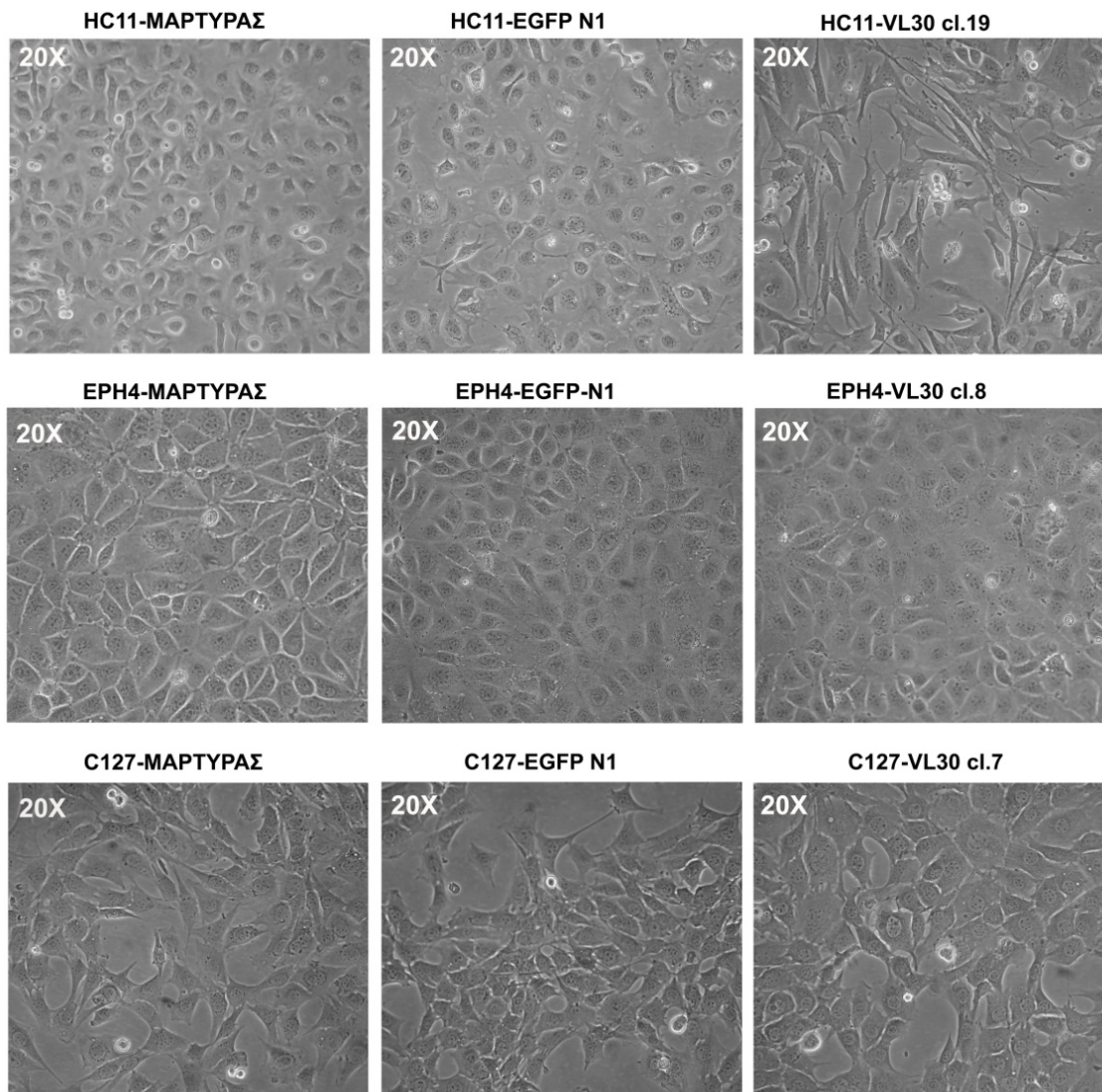
3.1.3 Η ρετρομετάθεση VL30 και LINE-1 (L1) οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό των προγονικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού HC11

Τα παραπάνω αποτελέσματά μας (βλ. ενότητα 3.1.2), απέδειξαν μία ποικιλία στο ποσοστό παραγωγής γεγονότων ρετρομετάθεσης σε απομονωμένους κλώνους HC11-VL30, EPH4-VL30, C127-VL30, HC11-L1 και HC11-DO.MT. Το γεγονός αυτό, δεδομένου του μεταλλαξιγόνου χαρακτήρα της ρετρομετάθεσης, μας ώθησε να ερευνήσουμε για πιθανές επιπτώσεις που θα μπορούσε να προκαλεί η ρετρομετάθεση σε κύτταρα κλώνων.

Είναι γνωστό ότι τα επιθηλιακά κύτταρα μετά από μετασχηματισμό αποκτούν φαινότυπο ομοιάζοντα με εκείνο των ινοβλαστικών κυττάρων (fibroblast-like phenotype). Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial to mesenchymal transition). Η EMT διαδραματίζει κύριο ρόλο στην εμβρυογένεση συμβάλλοντας στην διαφοροποίηση επιθηλιακών κυττάρων προς μεσεγχυματικά, ενώ επαγωγή της στην ενήλικη ζωή εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις και στην καρκινογένεση. Επομένως στο περαιτέρω χαρακτηρισμό κυττάρων από επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης βαρύνουσα σημασία είχε η μορφολογική εξέταση και σύγκριση των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων με τα αντίστοιχα ανά περίπτωση κύτταρα-μάρτυρες.

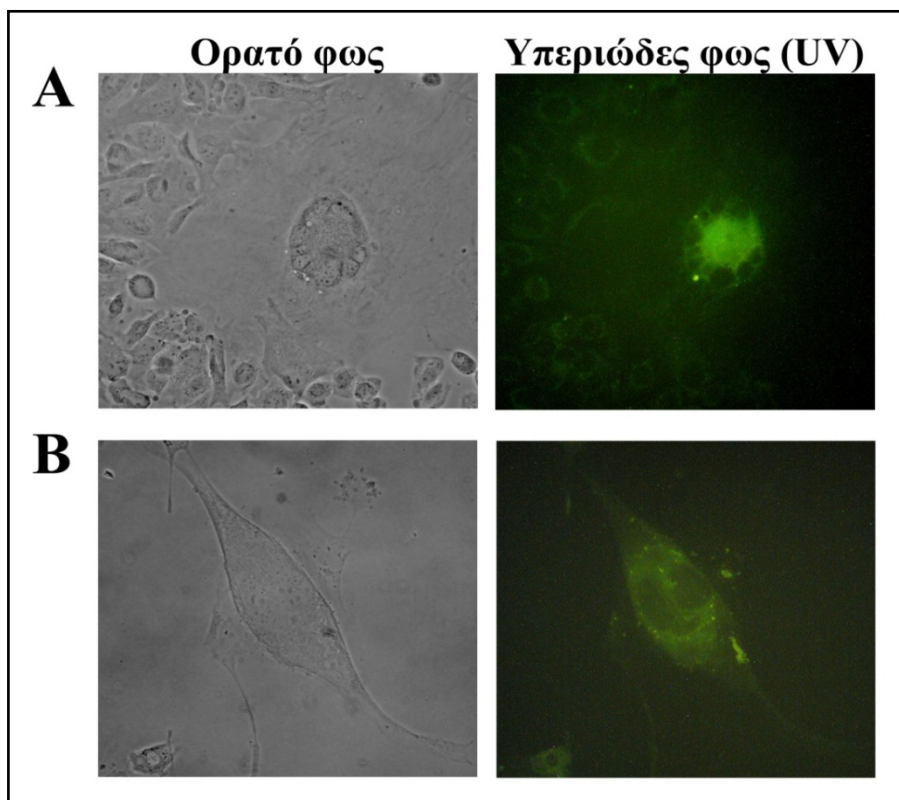
Αρχικά, ελέγχθηκε η πιθανή αλλαγή της κυτταρικής μορφολογίας, ως συνολική Εικόνα των επιπτώσεων, μετά από καλλιέργεια κλώνων που ήταν θετικοί σε ρετρομετάθεση των VL30: HC11-VL30, EPH4-VL30 και C127-VL30. Στη λογική αυτή πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και φωτογράφιση των κυττάρων-μαρτύρων HC11 ή EPH4 ή C127 συγκριτικά με τα αντίστοιχα θετικά ρετρομετάθεσης VL30 κύτταρα κλώνων από κάθε περίπτωση. Διαπιστώσαμε ότι η ρετρομετάθεση του στοιχείου VL30 οδήγησε στον μετασχηματισμό μόνο των προγονικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού HC11. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4 τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα του αντιπροσωπευτικού κλώνου HC11-VL30 c1.12 παρουσίασαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές, συνοδευόμενες από απώλεια της κλασικής επιθηλιακής μορφολογίας και απόκτησης μορφολογίας μεσεγχυματικού τύπου. Σημειωτέον, όλοι οι κλώνοι HC11-VL30 που εξετάστηκαν έφεραν την ίδια μεσεγχυματική μορφολογία. Αντίθετα, όλοι οι προς εξέταση κλώνοι EPH4-VL30 και C127-VL30 δεν παρουσίασαν φαινοτυπικές αλλαγές συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα πρώτο

τεκμήριο ότι οι ιδιότητες προγονικών και βλαστικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς HC11 αποτελούν ευκολότερα στόχους μετασχηματισμού εν συγκρίσει με τα διαφοροποιημένα κύτταρα.



Εικόνα 3.4: Η ρετρομετάθεση των VL30 συμβάλλει στην μετατροπή της κλασικής επιθηλιακής μορφολογίας προς ινοβλαστικό/μεσεγχυματικό φαινότυπο μόνο στα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού HC11. Απεικονίζεται η μορφολογία κυττάρων HC11, EPH4 και C127, πριν την διαμόλυνση (μάρτυρες), μετά την διαμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-N1 ή το ρετροτρανσποζόνιο pVL30-EGFP-INT (VL30). Η διαμόλυνση των τριών κυτταρικών σειρών με το στοιχείο VL30, οδήγησε στην αλλαγή μορφολογίας στα προγονικά κύτταρα μαστού HC11, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο στις διαφοροποιημένες σειρές EPH4 και C127.

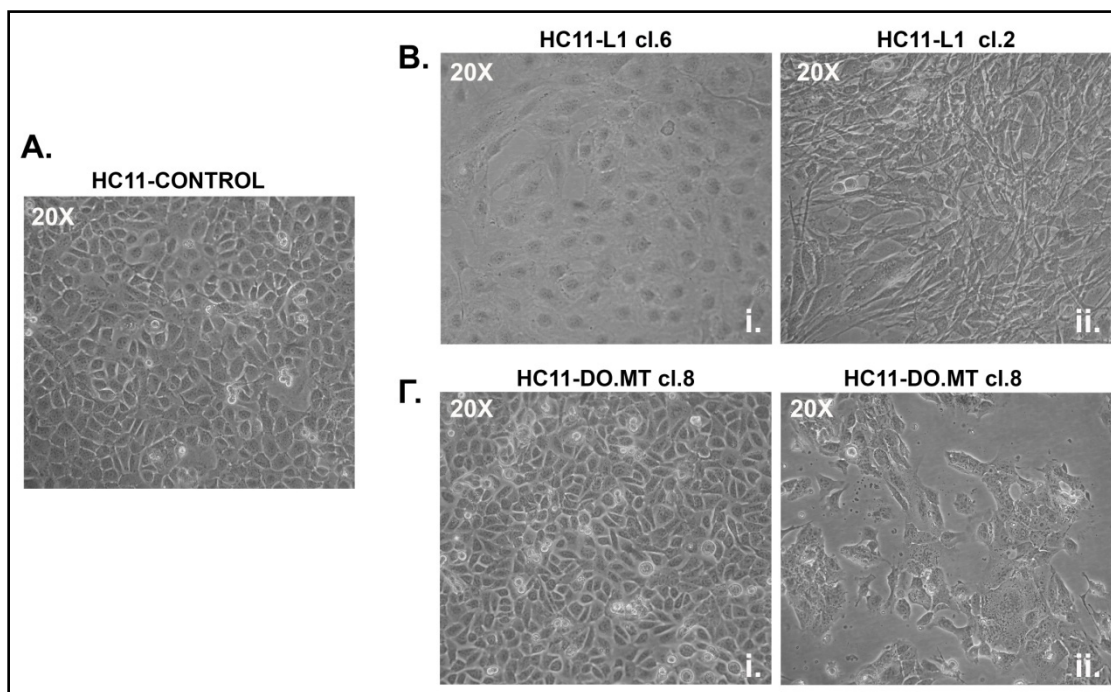
Επιπλέον, με σκοπό να αποκλείσουμε τις οποιεσδήποτε αμφιβολίες εμπλοκής της EGFP πρωτεΐνης στο μετασχηματισμό των κυττάρων πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση όλων των κυτταρικών σειρών (HC11, EPH4 και C127) με το πλασμίδιο EGFP-N1. Στην συνέχεια απομονώθηκαν μαζικοί κλώνοι από κάθε περίπτωση κυτταρικής σειράς, με τη χορήγηση στις κυτταροκαλλιέργειες του αντιβιοτικού νεομυκίνη (G418). Δεν παρατηρήθηκαν φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα από την πρωτεΐνη EGFP (Εικόνα 3.4), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων HC11 προκαλούνται μόνο από τα γεγονότα ρετρομετάθεσης VL30.



Εικόνα 3.5: Αντιπροσωπευτικά πολυπύρρηνα κύτταρα εκφράζουν έντονα την πρωτεΐνη EGFP, υποδεικνύοντας ότι είναι θετικά σε γεγονότα ρετρομετάθεσης. Κύτταρα μαζικών κλώνων HC11-VL30 (A), καθώς και κύτταρα από τον κλώνο HC11-VL30 cl.1 (B) αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν με παραφορμαλδεύδη και παρατηρήθηκαν στο ορατό (αριστερά) και υπεριώδες φως (δεξιά) σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των κυττάρων μαζικών κλώνων HC11-VL30 παρουσιάστηκε επίσης φαινοτυπική ετερογένεια του κυτταρικού πληθυσμού με την ύπαρξη πεπλατυσμένων πολυπύρρηγων κυττάρων, που στοιχειοθετούν

γενωμική αστάθεια και θύμιζαν φαινόμενα κυτταρικής γήρανσης (Εικόνα 3.5). Ιδιαίτερα στην ακραία περίπτωση των κυττάρων του κλώνου HC11-VL30 cl.1, ενός κλώνου με το πολύ υψηλό ποσοστό ρετρομετάθεσης (21%) (Εικόνα 3.1A.III), παρατηρήθηκαν έντονα κυτταροτοξικά φαινόμενα και μεγάλος αριθμός πολυπύρηνων κυττάρων, γεγονός που καθυστέρησε την ανάπτυξη και περαιτέρω μελέτη των καθώς τελικά οδηγήθηκαν σε κυτταρικό θάνατο. Η ύπαρξη πολυπύρηνων κυττάρων συνδέεται με την υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης και την παρουσία πράσινων κυττάρων, όπως αποδείχθηκε έπειτα από μονιμοποίηση και ακόλουθη παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού, κυττάρων μαζικών κλώνων (Εικόνα 3.5 A) καθώς και του κλώνου 1 (Εικόνα 3.5 B). Και στις δύο περιπτώσεις τα πεπλατυσμένα, πολυπύρηννα κύτταρα παρουσίασαν έντονη έκφραση της πρωτεΐνης EGFP.



Εικόνα 3.6: Φαινοτυπικές επιπτώσεις ρετρομετάθεσης *LINE* και *DO.MT* σε κύτταρα *HC11*. *A.* Επιθηλιακός φαινότυπος κυττάρων *HC11*. *B.* Η ρετρομετάθεση του ανθρώπινου ρετροτρανσποζονίου *L1* προκαλεί μορφολογικές αλλαγές σε κύτταρα *HC11*. Παρουσιάζεται η μετάπτωση της επιθηλιακής προς μεσεγγυματική μορφολογία δύο θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων *HC11-L1* (*Bi, ii*). *Γ.* Στην περίπτωση των κυττάρων *HC11-DO.MT* δεν σημειώθηκαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές (*Γ. i*) με εξαίρεση την περίπτωση του κλώνου 9, όπου παρατηρήθηκαν κυτταροτοξικά φαινόμενα (*Γ.ii*).

Τέλος, εξετάσαμε πιθανές μορφολογικές αλλαγές στα διαμολυσμένα κύτταρα HC11 με το ανθρώπινο ρετροτρανσποζόνιο LINE-1 (L1) ή το ρετροϊό MoMLV ως ρετροτρανσποζόνιο (DO.MT). Παρατηρήσαμε ότι η ρετρομετάθεση των L1 επάγει επίσης σημαντικές φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα HC11, προσδίδοντας μια μεσεγχυματικού τύπου μορφολογία, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των κυττάρων HC11-VL30. Στην Εικόνα 3.6 Βi-ii παρουσιάζονται φαινοτυπικές αλλαγές δυο αντιπροσωπευτικών κλώνων HC11-L1 (c1.6 & c1.2), μετά την διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HC11 με το ανθρώπινο ρετροτρανσποζόνιο LINE-1 (L1). Στην περίπτωση των διαμολυσμένων κυττάρων HC11 με το ρετροτρανσποζόνιο DO.MT δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μορφολογικές αλλαγές στους περισσότερους κλώνους, πλην μιας αυξημένης προσκόλλησης στο ταπήτιο καλλιέργειας (Εικόνα 3.6 Γ.i). Στον κλώνο HC11-DO.MT c1.9 παρατηρήθηκαν κυτταροτοξικά φαινόμενα θανάτου και δυσκολία στην ανάπτυξή του (Εικόνα 3.6 Γ.ii).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τα εξής:

α. η ρετρομετάθεση του ρετροστοιχείου VL30, συμβάλει στον μετασχηματισμό της κλασσικής επιθηλιακής μορφολογίας και στην επακόλουθη απόκτηση ενός μεσεγχυματικού φαινότυπου μόνο στα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού HC11 και όχι στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (EPH4 και C127). Επιπλέον, η ρετρομετάθεση των VL30 στα κύτταρα HC11 μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικά φαινόμενα, και την δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων, σημαντικών ενδείξεων γενωμικής αστάθειας και μετασχηματισμένου φαινότυπου. Συνολικά, οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν ότι τα προγονικά κύτταρα μαστού αποτελούν ευκολότερα στόχους μετασχηματισμού, εν συγκρίσει με τα διαφοροποιημένα κύτταρα.

β. το ανθρώπινο ρετροτρανσποζόνιο LINE-1 (L1), προκαλεί επίσης φαινοτυπική μετάπτωση από την επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μορφολογία σε κύτταρα HC11.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματά μας οδηγηθήκαμε στο ερώτημα μήπως η ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30 και L1 είναι ικανή να οδηγήσει στην μετάπτωση EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) σε προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού HC11.

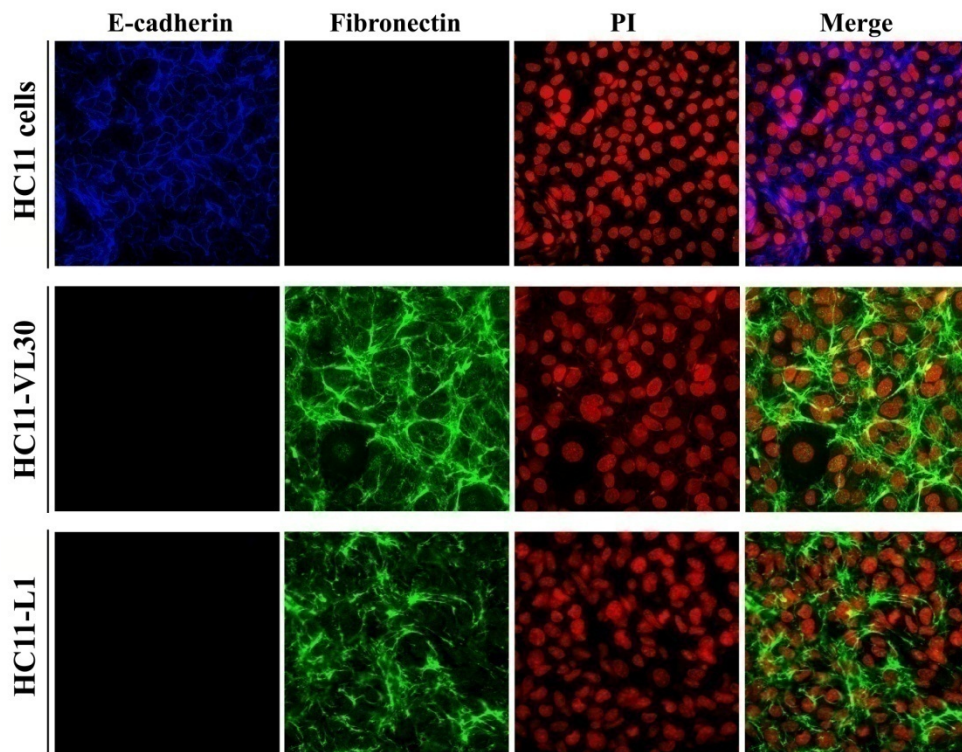
3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ EMT

Σήμερα, πιστεύεται ότι η διαδικασία EMT, κρίσιμη διαδικασία κατά την εμβρυογένεση, ενεργοποιείται επίσης κατά την ογκογένεση και κατέχει κοινές ιδιότητες με αυτές των μεταστατικών κυττάρων όπως της διαταραχής των διακυτταρικών συνδέσεων, ενίσχυσης της κυτταρικής κινητικότητας και απόκτησης ενός μεσεγχυματικού φαινοτύπου. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια της EMT, τα επιθηλιακά κύτταρα υπόκεινται σε δραματικές αλλαγές, με αποτέλεσμα την απώλεια των απαραίτητων για τη διατήρηση του επιθηλιακού φαινοτύπου προσκολλητικών συνδέσεων μειορρυθμίζοντας πρωτεΐνες όπως είναι η E-καντερίνη (*E-cadherin*). Συγχρόνως, δε, εκφράζουν πρωτεΐνες μεσεγχυματικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένης της N-καντερίνης (*N-cadherin*), φιβρονεκτίνης (*fibronectin*) και βιμεντίνης (*vimentin*). Αλλαγές στον κυτταρικό φαινότυπο, όπως αυτές που προκαλούνται από την EMT, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων, εμπλέκονται στην υποτροπή όγκων και συχνά συνδέονται με φτωχή πρόγνωση σε γυναίκες που πάσχουν από καρκίνο μαστού.

3.2.1 Τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 αποκτούν τα βασικά χαρακτηριστικά της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάπτωσης.

Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν η ρετρομετάθεση των ρετροτρανσποζονίων VL30 και LINE-1 (L1) ωθεί τη μετατροπή των προγονικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού HC11 σε μεσεγχυματικού τύπου κύτταρα, μέσω της μετάπτωσης EMT, μελετήσαμε την έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών.

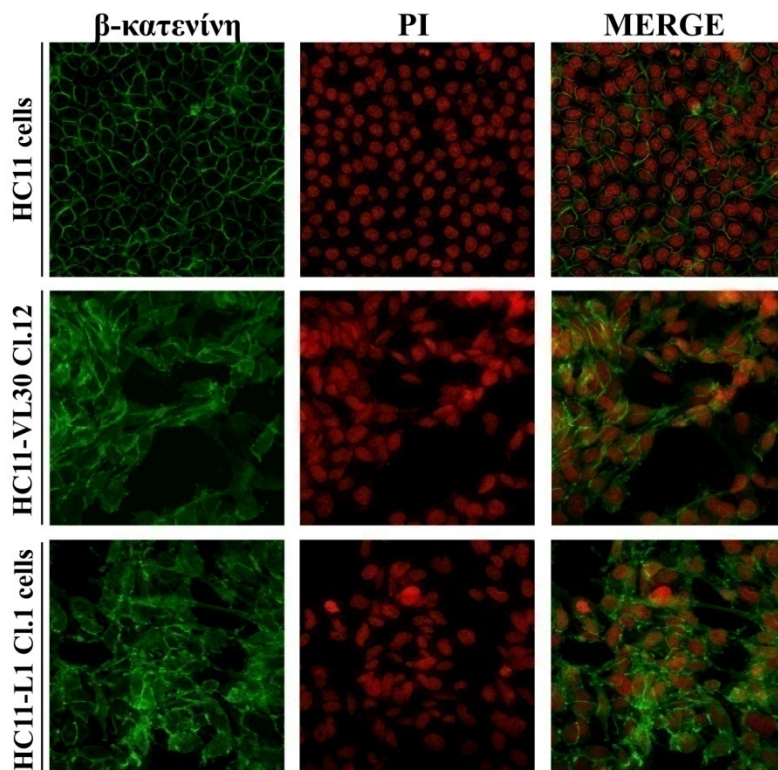
Γνωρίζοντας ότι τα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν στρώματα κυττάρων στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω προσκολλητικών συνδέσεων, σε ένα πρώτο βήμα εξετάσαμε την έκφραση του κατεξοχήν επιθηλιακού-προσκολλητικού μορίου της E-καντερίνης (*E-cadherin*). Το μόριο της E-καντερίνης αποτελεί επιθηλιακό δείκτη και θεωρείται κρίσιμο για την διατήρηση του επιθηλιακού φαινοτύπου, καθώς τυχόν μείωση ή απώλεια στην έκφραση της οδηγεί σε διαταραχές στον επιθηλιακό φαινότυπο. Σε αντιπαράθεση εξετάσαμε την έκφραση του μορίου της φιβρονεκτίνης ως δείκτη μεσεγχυματικού τύπου κυττάρου.



Εικόνα 3.7: Έμμεσος ανοσοφθορισμός ανίχνευσης *E*-καντερίνης (*E-cadherin*) και φιβρονεκτίνης (*Fibronectin*) σε θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα *HC11-VL30 cl.12*, *HC11-L1 cl.6* και κύτταρα μάρτυρες *HC11*. Κύτταρα αναπτύχθηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της *E*-καντερίνης, φιβρονεκτίνης και με δευτεροταγή αντισώματα που έφεραν ομοιοπολικά συνδεδεμένα τα χρωμοφόρα: Cy5 για *E*-καντερίνη (μπλε χρώμα) και FITC για φιβρονεκτίνη (πράσινο χρώμα). Οι πυρήνες χρώσθηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (PI) (κόκκινο χρώμα). Τα δείγματα παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο. Αριστερή πρώτη κάθετη στήλη: κύτταρα –μάρτυρες *HC11*, *HC11-VL30* και *HC11-L1* χρωσμένα ως προς *E*-καντερίνη. Δεύτερη κάθετη στήλη: κύτταρα *HC11*, *HC11-VL30* και *HC11-L1* χρωσμένα ως προς φιβρονεκτίνη. Τρίτη κάθετη στήλη: κύτταρα *HC11*, *HC11-VL30* και *HC11-L1* χρωσμένα με PI. Τέταρτη κάθετη στήλη: Επικάλυψη των δύο χρώσεων κάθε περίπτωσης.

Στην λογική αυτή, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για το μόριο της *E*-καντερίνης και φιβρονεκτίνης, με χρήση ειδικών αντισωμάτων και ακόλουθη παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο, στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους *HC11-VL30* και *HC11-L1* χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα κύτταρα *HC11*. Στην Εικόνα 3.7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης του δικτύου των προς μελέτη πρωτεϊνών μετά από παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρήθηκε απώλεια

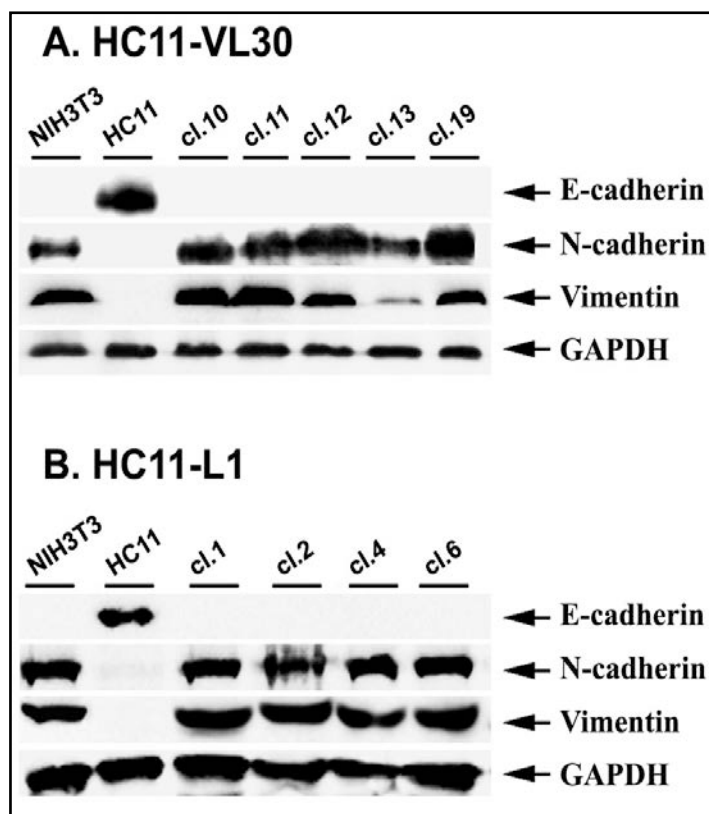
έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-καντερίνης και απόκτηση έκφρασης του μεσεγχυματικού δείκτη της φιβρονεκτίνης στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 cl.12 και HC11-L1 cl.6, σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες τα οποία διατηρούν τη φυσιολογική έκφραση του επιθηλιακού δικτύου της E-καντερίνης ενώ απουσιάζει η έκφραση του δικτύου της φιβρονεκτίνης, όπως αναμενόταν.



Εικόνα 3.8: Έμμεσος ανοσοφθορισμός ανίχνευσης β-κατενίνης σε θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 cl.12, HC11-L1 cl.6 και κύτταρα μάρτυρες HC11. Κύτταρα αναπτύχθηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της β-κατενίνης και με το δευτεροταγές αντίσωμα που φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το χρωμοφόρο FITC (πράσινο χρώμα). Οι πυρήνες χρώσθηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (PI) (κόκκινο χρώμα). Τα δείγματα παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο. Αριστερή πρώτη κάθετη στήλη: κύτταρα – μάρτυρες HC11, HC11-VL30 cl.12 και HC11-L1 cl.6 χρωσμένα ως προς τη β-κατενίνη. Δεύτερη κάθετη στήλη: κύτταρα HC11, HC11-VL30 cl.12 και HC11-L1 cl.6 χρωσμένα με PI. Τρίτη κάθετη στήλη: Επικάλυψη των δύο χρώσεων κάθε περίπτωσης.

Συμπληρωματικά, σε ένα επόμενο στάδιο ελέξαμε με ανοσοφθορισμό την έκφραση του δικτύου της β-κατενίνης. Γνωρίζουμε ότι, οι E-καντερίνες απαντώνται στην κυτταρική μεμβράνη ως ετεροδιμερή συνδεδεμένα με τον κυτταροσκελετό (ακτίνη) μέσω

ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που περιλαμβάνει την α -, β - και p120-κατενίνη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8, η β -κατενίνη στα επιθηλιακά κύτταρα HC11 εντοπίζεται διαμεμβρανικά και σχηματίζει ένα καλοσχηματισμένο δίκτυο όπως αναμενόταν σε αντίθεση με τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 cl.12 και HC11-L1 cl.6, στα οποία εντοπίζεται διάχυτη στο εσωτερικό των κυττάρων (κυτταρόπλασμα).



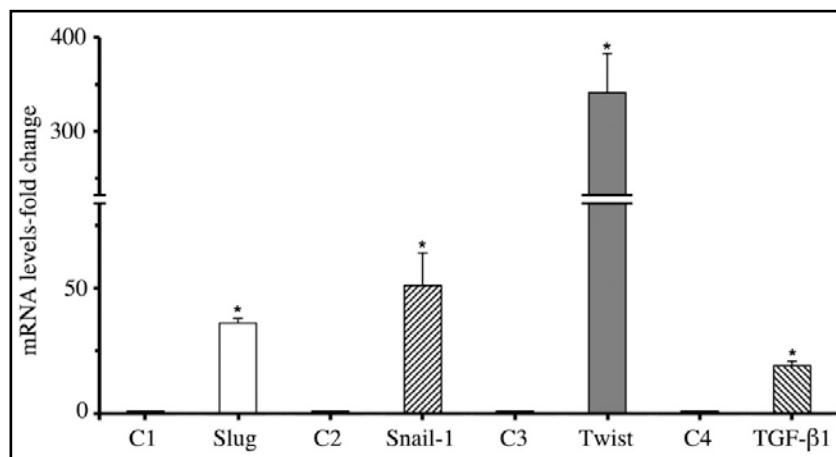
Εικόνα 3.9: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο πρωτεϊνικής έκφρασης των E-καντερίνης (E-cadherin), N-καντερίνης (N-cadherin) και βιμεντίνης (vimentin) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μονήρων κλώνων κυττάρων HC11-VL30 (A) και HC11-L1 (B). 40 μ g πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κλώνους HC11-VL30 και HC11-L1 καθώς και κυττάρων NIH3T3 και HC11 ως μαρτύρων, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 10% δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες και μεταχειρίστηκαν με αντισώματα έναντι των E-καντερίνης, N-καντερίνης, βιμεντίνης καθώς και της GAPDH, για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν δευτεροταγή αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο της ραφανικής υπεροξειδάσης.

Οι παραπάνω ισχυρές ενδείξεις για επαγωγή της μετάπτωσης EMT στοιχειοθετήθηκαν περαιτέρω, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blotting). Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από μονήρεις κλώνους,

τόσο από τα κύτταρα HC11-VL30 (κλώνοι 10, 11, 12, 13 και 19), όσο και από τα κύτταρα HC11-L1 (κλώνοι 1, 2, 4 και 6). Επίσης πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν από κύτταρα μάρτυρες HC11, ως θετικού μάρτυρα έκφρασης δεικτών επιθηλιακού τύπου, όπως και από ινοβλάστες NIH3T3, ως θετικού μάρτυρα προς την έκφραση δεικτών μεσεγγύματος. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western εξετάζοντας την έκφραση των πρωτεϊνών: E-καντερίνης, N-καντερίνης και βιμεντίνης ενώ η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε μέσω της πρωτεΐνης GAPDH (Εικόνα 3.9).

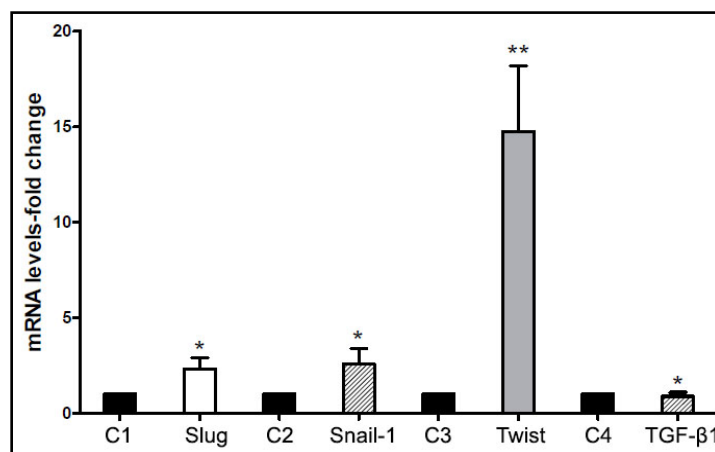
Όπως προκύπτει, από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.9, όλοι οι προς εξέταση θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι HC11-VL30 (Εικόνα 3.9 A) και HC11-L1 (Εικόνα 3.9 B) παρουσιάζουν απώλεια πρωτεϊνικής έκφρασης του επιθηλιακού μορίου της E-καντερίνης ενώ παρατηρείται έκφραση των χαρακτηριστικών μορίων μεσεγγυματικού τύπου της N-καντερίνης και βιμεντίνης. Αντίθετα, τα επιθηλιακού τύπου κύτταρα HC11-μάρτυρες παρουσίασαν έκφραση μόνο ως προς το μόριο της E-καντερίνης και τα μεσεγγυματικού τύπου ινοβλαστικά κύτταρα NIH3T3, παρουσίασαν έκφραση μόνο της N-καντερίνης και βιμεντίνης, όπως και αναμενόταν.

Τέλος, βιβλιογραφικά έχουν καταγραφεί διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται στην επαγωγή EMT, μέσω μειορύθμισης της E-καντερίνης. Στο σημείο αυτό, για να ισχυροποιήσουμε περαιτέρω την συσχέτιση της ρετρομετάθεσης με την επαγωγή EMT, στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, εξετάσαμε σε επίπεδο mRNA την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Slug, Snail, Twist και της κυτοκίνης TGF- β 1, μέσω της τεχνικής Real-Time PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών (primers) έναντι αυτών των γονιδίων. Παρασκευάσαμε cDNA από θετικούς ρετρομετάθεσης μαζικούς κλώνους τόσο από τα κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 καθώς και από κύτταρα μάρτυρες HC11. Τα αποτελέσματα μας κατέδειξαν ισχυρή επαγωγή και αύξηση της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων και στις δύο περιπτώσεις κυττάρων (HC11-VL30 ή HC11-L1) συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες HC11 (Εικόνα 3.10 & 3.11). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των κυττάρων HC11-VL30 τα επίπεδα mRNA για τα γονίδια TGF- β 1, Slug και Snail, παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση κατά ~ 19-, 36- και 52-φορές μεγαλύτερη αντίστοιχα, συγκριτικά με τον μάρτυρα, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η αύξηση της επαγωγής κατά 341-φορές του γονιδίου Twist (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Η ρετρομετάθεση VL30 συσχετίζεται με την υπερέκφραση mRNA γνωστών δεικτών της EMT. Παρουσιάζεται η μεταβολή των επιπέδων mRNA των μεταγραφικών παραγόντων Slug, Snail, Twist και TGF-β1 με τη χρήση Real Time PCR, σε θετικούς ρετρομετάθεσης μαζικούς κλώνους HC11-VL30, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες HC11 (C1,C2,C3,C4). * $P < 0.05$.

Όσο αφορά τα επίπεδα mRNA των γονιδίων αυτών στους θετικούς ρετρομετάθεσης μαζικούς κλώνους HC11-L1 σημειώθηκαν τα ακόλουθα ποσοστά αύξησης mRNA : ~2.3 φορές για το γονίδιο Slug, ~2.5 φορές για το Snail και ~15 φορές για το Twist, ενώ δε σημειώθηκε ιδιαίτερη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου TGF-β1 συγκριτικά με τον μάρτυρα HC11 (Εικόνα 11).

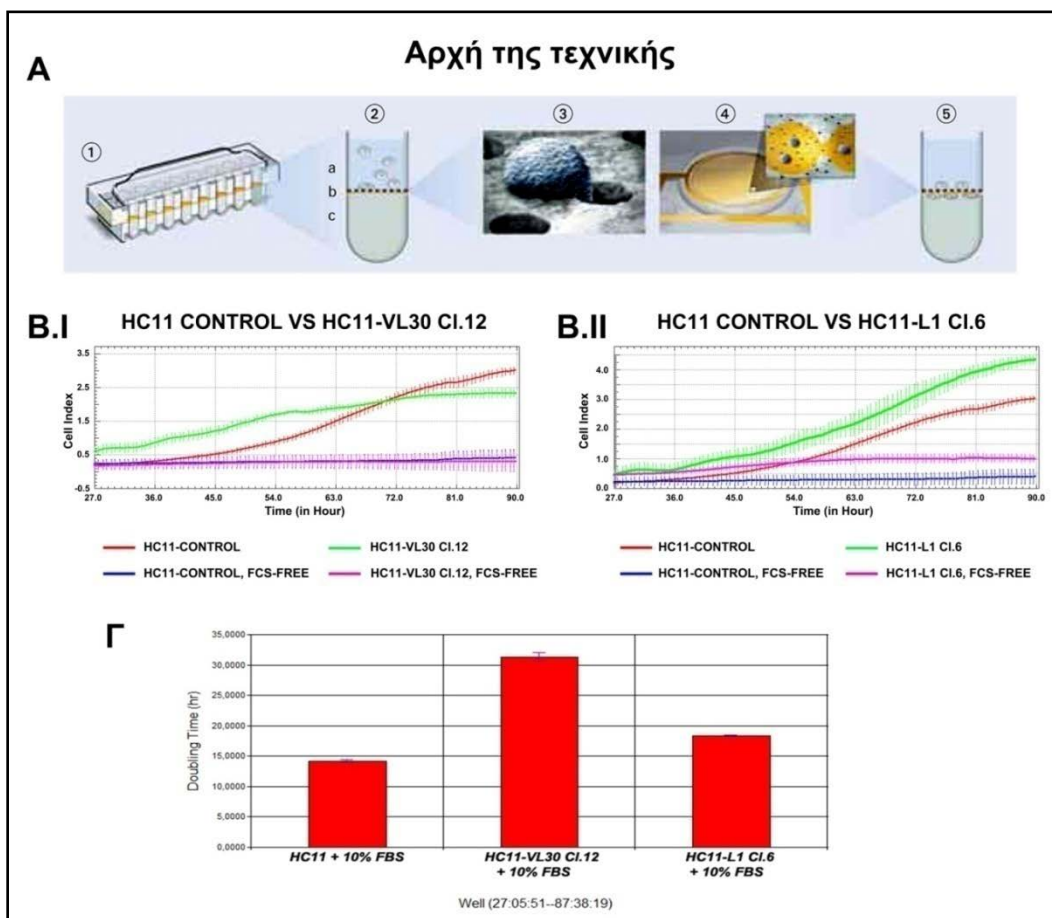


Εικόνα 3.11: Η ρετρομετάθεση LINE-1 συσχετίζεται με την μεταγραφική επαγωγή των παραγόντων Slug, Snail και Twist, γνωστών δεικτών της EMT. Με τη χρήση της τεχνικής Real Time PCR, εξετάσαμε τη μεταβολή των επιπέδων mRNA των μεταγραφικών παραγόντων Slug και Snail, Twist και TGF-β1 σε κύτταρα μαζικών κλώνων HC11-L1, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες HC11. Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης mRNA των μεταγραφικών παραγόντων Slug, Snail, Twist. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Με βάση τα παραπάνω, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30 και L1 προκαλεί την επαγωγή της μετάπτωσης EMT σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού HC11 μύος.

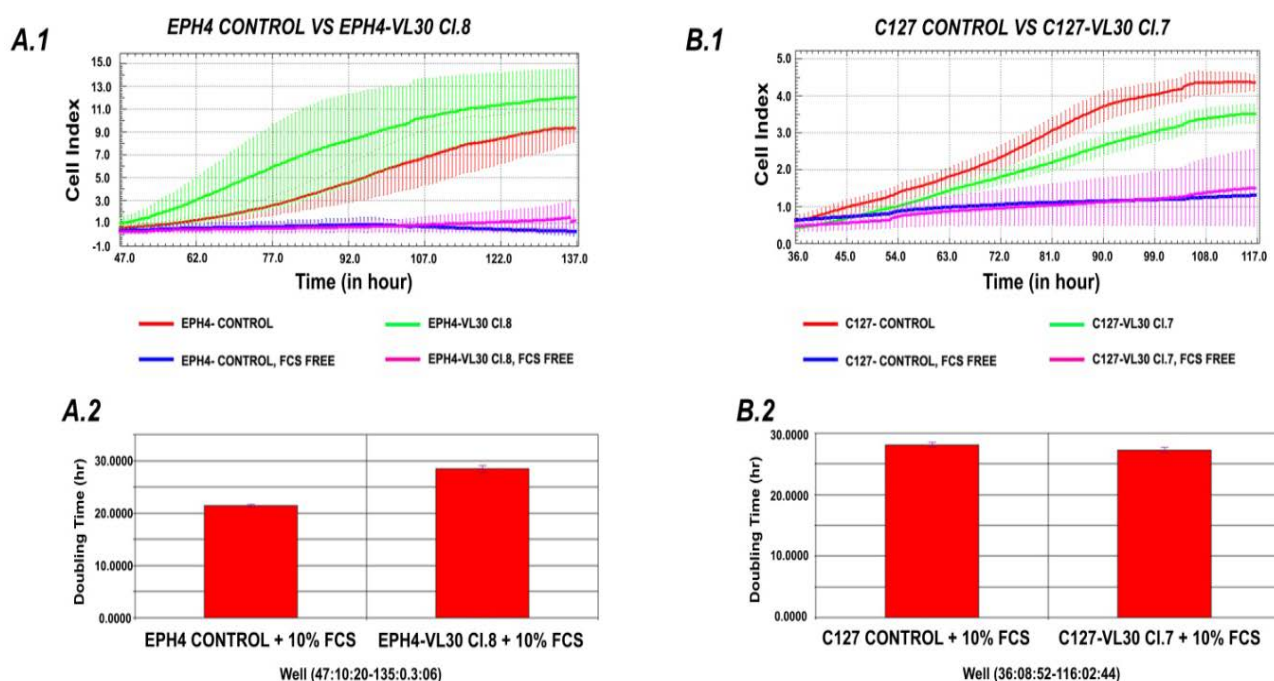
3.2.2 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCA DP-XCelligence

Η EMT αποτελεί μια μοριακή διεργασία, θεμελιώδους σημασίας κατά την μετάσταση επιθηλιακών καρκίνων, καθώς αυξάνει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και συνδέεται με την απόκτηση φαινοτυπικών χαρακτήρων που τους δίνουν την δυνατότητα διείσδυσης σε άλλους ιστούς. Βάσει αυτού, και δεδομένου της συσχέτισης της ρετρομετάθεσης με την επαγωγή EMT στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, ως επόμενο βήμα μελετήσαμε την αύξηση της κυτταρικής διεισδυτικότητας και μετανάστευσης μέσω του αναλυτή RTCA-DP (τεχνολογία RTCADP-Xcelligence) και την χρήση ειδικών πολυτρυβλίων (CIM plates). Η μέθοδος αυτή είναι ιδανική για να εξετάσουμε την απόκριση των κυττάρων στο λεγόμενο έλεγχο wound healing test. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (CIM PLATES), τα οποία χωρίζονται σε 2 υποθαλάμους (Εικόνα 3.12 Α). Στον πάτο του επάνω υποθαλάμου βρίσκεται μια μεμβράνη PET (polyethyleneterephthalate) με μικροπόρους, η οποία φέρει μικροηλεκτρόδια ενσωματωμένα στην κάτω πλευρά της. Όσα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύσουν διαπερνούν τους μικροπόρους της μεμβράνης και προσκολλώνται στην κάτω επιφάνειά της αυξάνοντας την ηλεκτρική αντίσταση στους αισθητήρες των μικροηλεκτροδίων. Μέσω των ηλεκτροδίων το μηχάνημα καταγράφει ανά χρονική στιγμή την κινητική κατάσταση των κυττάρων, κατασκευάζοντας 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. Να σημειωθεί ότι το πείραμα πραγματοποιήθηκε για 2 κλώνους ανά περίπτωση κυττάρων HC11-VL30, HC11-L1, EPH4-VL30 και C127-VL30. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των κυττάρων μαρτύρων HC11 ή EPH4 ή C127.



Εικόνα 3.12: Αύξηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων HC11-VL30 και HC11-L1. Παρατίθεται η αρχή της τεχνικής μέτρησης μεταστατικού δυναμικού με τον αναλυτή RTCA-DP και τη χρήση ειδικών πολυτρυβλίων, CIM-Plate (CIM= Cell Invasion & Migration). (A) : 1. Απεικονίζονται τα 8 από τα 16 πηγάδια (wells) του CIM-Plate 16, 2. Σχηματική αναπαράσταση ενός well από το πολυτρυβλίο CIM-Plate 16 (a) πάνω υποθάλαμος, (b) μεμβράνη, η οποία φέρει μικροπόρους και αισθητήρες ηλεκτροδίων στην κάτω επιφάνεια της, (c) κάτω υποθάλαμος. 3. Κυτταρική μετανάστευση κυττάρων από τον πάνω στον κάτω υποθάλαμο μέσω της μεμβράνης. Τα κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στον κάτω υποθάλαμο βρίσκονται σε άμεση επαφή με τους αισθητήρες των μικροηλεκτροδίων. 4. Λεπτομερής απεικόνιση των αισθητήρων μικροηλεκτροδίων στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης μαζί με τα προσκολλημένα κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει. 5. Σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει και βρίσκονται προσκολλημένα στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης. (B) Παρουσιάζεται η μεταβολή μεταστατικού δυναμικού αντιπροσωπευτικών θετικών ρετρομετάθεσης και πιστοποιημένης EMT κυττάρων HC11-VL30 cl.12 (B.I) και HC11-LINE-1 cl.6 (B.II), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες (control) HC11. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων, παρουσιάζονται το Cell Index (CI), δηλαδή μια ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει, συναρτήσει του χρόνου. ((Γ) Γραφική παράσταση ως προς τον χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 παρουσίασαν αύξηση του ρυθμού διπλασιασμού των συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες HC11.

Στην Εικόνα 3.12, παρουσιάζεται η μεταβολή μεταστατικού δυναμικού αντιπροσωπευτικών κυττάρων κλώνων θετικών ρετρομετάθεσης με πιστοποιημένη EMT HC11-VL30 cl.12 (Εικόνα 3.12 B.I) και HC11- L1 cl.6 (Εικόνα 3.12 B.II), σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες-HC11 (control). Τα αποτελέσματα συνοδεύονται από τα αντίστοιχα διαγράμματα ως προς τον χρόνο διπλασιασμού. Και στις 2 περιπτώσεις διαμόλυνσης των κυττάρων HC11 με τα ρετροτρανσποζόνια VL30 ή L1 αυξάνεται ο ρυθμός διπλασιασμού των συγκριτικά με τους μάρτυρες, γεγονός που στοιχειοθετεί την αύξηση του μεταστατικού δυναμικού των εξετασθέντων κλώνων.



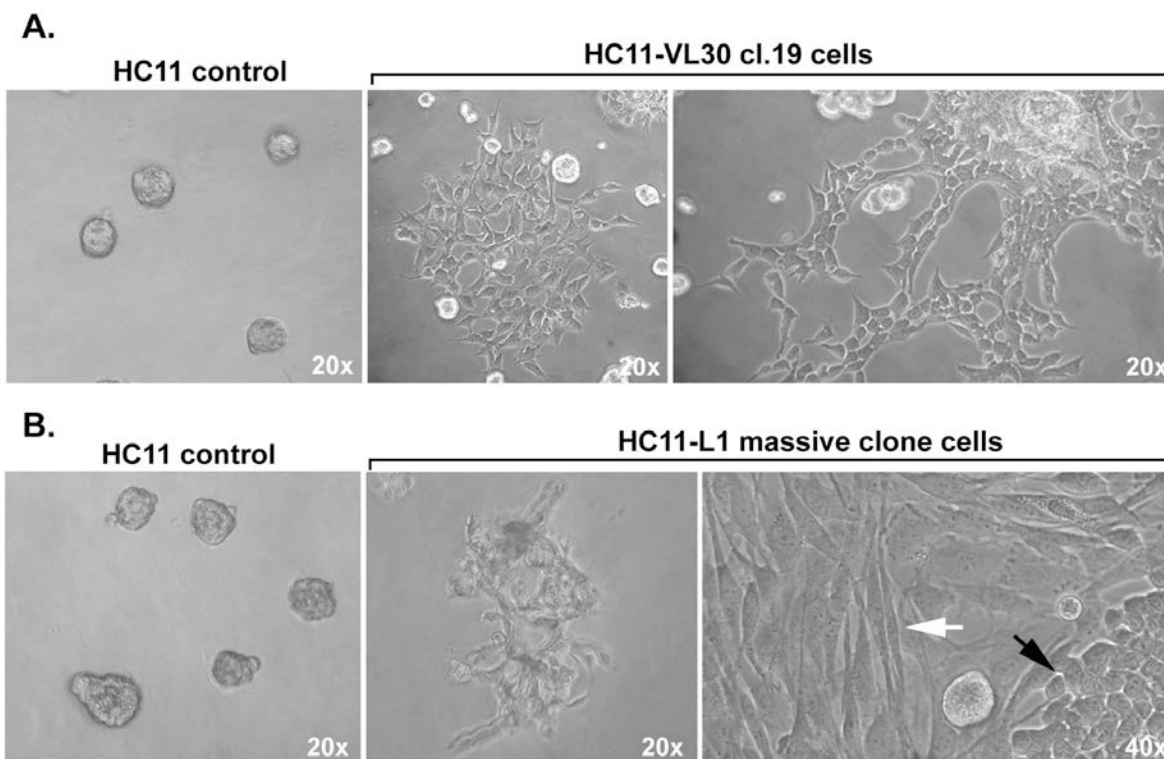
Εικόνα 3.13: Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων EPH4-VL30 και C127-VL30 συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες EPH4 και C127, αντίστοιχα. Παρουσιάζεται η μεταβολή μεταστατικού δυναμικού θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων EPH4-VL30 Cl.8 (A.1) και C127-VL30 Cl.7 (B.1), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες (control). Τα αποτελέσματα συνοδεύονται από τα αντίστοιχα διαγράμματα ως προς τον χρόνο διπλασιασμού (A.2 & B.2). Παρατηρείται αύξηση του ρυθμού διπλασιασμού, στα κύτταρα EPH4-VL30 Cl.8 συγκριτικά με τους μάρτυρες (A.2), που επιβεβαιώνει την αύξηση του μεταστατικού δυναμικού που παρουσιάζεται στο γράφημα A1. Τα κύτταρα C127-VL30 Cl.7 δεν παρουσιάζουν αύξηση του μεταστατικού δυναμικού (A.2), ούτε σημαντική μεταβολή του χρόνου διπλασιασμού τους (B.2).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων EPH4-VL30, παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του μεταστατικού δυναμικού τους συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες EPH4 (Εικόνα 3.13 Α). Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει ότι η ρετρομετάθεση ως παράγοντας δύναται να αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων μαστού ποντικού. Εξαίρεση αποτέλεσε η καρκινική σειρά μαστού C127, όπου τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα C127-VL30 δεν εμφάνισαν αύξηση του μεταστατικού δυναμικού συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες, καθώς επίσης ο χρόνος διπλασιασμού τους διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα με εκείνα των κυττάρων μαρτύρων C127 (Εικόνα 3.13 Β).

Τα αποτελέσματά μας αποτελούν μια πρώτη ισχυρή πειραματική ένδειξη ότι η ρετρομετάθεση ως ερέθισμα μπορεί να αυξήσει το μεταστατικό δυναμικό των κυτταρικών σειρών μαστού HC11 και EPH4.

3.2.3 Ανάπτυξη θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 και HC11-L1 σε matrigel

Συμπληρωματικά με τα ανωτέρω αποτελέσματα μας, προκειμένου να ενισχύσουμε την παρατήρηση μας ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30 και LINE-1 δύναται να αυξήσει το μεταστατικό δυναμικό των προγονικών κυττάρων μαστού ποντικού HC11 εξετάσαμε την ικανότητα διήθησης των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες HC11, έπειτα από ανάπτυξη σε Matrigel. Η υποστηρικτική ουσία/γέλη Matrigel αποτελεί εκχύλισμα πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης που προέρχονται από τον όγκο EHS (Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma) και σχηματίζει μια τρισδιάστατη γέλη στους 37°C υποστηρίζοντας την κυτταρική μορφογένεση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη όγκων, καθώς επίσης χρησιμοποιείται και στη μελέτη διήθησης καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 3.14: Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα *HC11-VL30* και *HC11-L1* παρουσιάζουν διηθητικό χαρακτήρα έπειτα από καλλιέργεια σε γέλη *Matrigel*. 10.000 κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων *HC11-VL30*, *HC11-L1* και μαρτύρων *HC11* αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε τρυβλία επιστρωμένα με γέλη *Matrigel*. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα έπειτα από καλλιέργεια των κυττάρων για 5 ημέρες. Τα κύτταρα μάρτυρες *HC11* αναπτύσσονται ως μικρές αποικίες σχηματίζοντας κυκλικές τρισδιάστατες δομές (*acinar-like structures in three-dimensional culture*), ενώ τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα κλώνων *HC11-VL30* (A) και *HC11-L1* (B) σχηματίζουν εκτενή κυτταρικά μορφώματα και μεταναστεύουν προς το εσωτερικό της γέλης *Matrigel*, παρουσιάζοντας αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, στοιχεία που υποστηρίζουν τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Ιδιαίτερα τα κύτταρα *HC11-L1* (B) διήθησαν ραγδαίως τη γέλη, οδηγώντας στο σχηματισμό 2 κυτταρικών τύπων: ένα καθαρά μεσεγχυματικού (άσπρο βέλος) και ένα προσομοιάζοντα με επιθηλιακό τύπο (μαύρο βέλος).

Για να εξετάσουμε την ικανότητα διήθησης των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων *HC11-VL30*, *HC11-L1* και μαρτύρων *HC11*, 10.000 κύτταρα ανά περίπτωση αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε τρυβλία επιστρωμένα με γέλη *Matrigel*. Τα αποτελέσματά μας, συμφωνούν με παρατηρήσεις άλλων μελετών όπου τα κακοήθη και μη-κακοήθη κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν βάσει της μορφολογίας τους, όταν αυτά καλλιεργηθούν στην επιφάνεια της γέλης *Matrigel*. Συγκεκριμένα έχουν δοθεί οι εξής

χαρακτηρισμοί: τα μη-κακοήθη κύτταρα αναπτύσσονται ως μικρές αποικίες σχηματίζοντας κυκλικές τρισδιάστατες δομές (acinar-like structures in three-dimensional culture), ενώ τα κακοήθη κύτταρα σχηματίζουν εκτενή κυτταρικά μορφώματα και μεταναστεύουν προς το εσωτερικό της γέλης Matrigel και δεν σχηματίζουν κυκλικές δομές. Πράγματι, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες, τα οποία σχημάτισαν μικρές κυκλικές τρισδιάστατες αλλά όχι διηθητικές αποικίες (acinar-like structures), τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, διήθησαν ραγδαίως τη γέλη παρουσιάζοντας αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, στοιχεία που υποστηρίζουν τη διηθητική δράση των καρκινικών κυττάρων. Ιδιαίτερα στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα μαζικών κλώνων HC11-L1 (Εικόνα 3.14 Β) το φαινόμενο της διήθησης ήταν εντονότερο, σχηματίζοντας πολλαπλές επιμηκυσμένες κυτταρικές δομές καταλήγοντας στον σχηματισμό 2 κυτταρικών τύπων: ένα καθαρά μεσεγχυματικού τύπου και ένα μάλλον επιθηλιακής διαφοροποίησης. Στην περίπτωση των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 c1.19 παρατηρήθηκε ανάπτυξη κυτταρικών συστάδων αποτελούμενες κυρίως από ίδιας μορφολογίας κύτταρα (Εικόνα 3.14 Α).

Συμπεραίνουμε ότι η ρετρομετάθεση των ρετροτρανσποζονίων VL30 και L1 αυξάνει την κυτταρική κινητικότητα των προγονικών κυττάρων μαστού ποντικού HC11, και κατ' επέκταση τα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα διήθησης. Οι παρατηρήσεις μας αυτές συμφωνούν και τεκμηριώνουν περαιτέρω την συσχέτιση της ρετρομετάθεσης με την επαγωγή EMT και την αύξηση μεταστατικού δυναμικού.

3.3 ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ VL30 ΚΑΙ LINE-1, ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΑΜΜΟΣΦΑΙΡΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα τελευταία χρόνια, υποστηρίζεται ότι η δημιουργία καρκινικών όγκων αρχίζει από μια μικρή ομάδα κυττάρων με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων (καρκινικά βλαστικά κύτταρα), τα οποία κάτω από συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης σχηματίζουν κυτταρικά συσσωματώματα ή μαμμόσφαιρες, και εκφράζουν ειδικούς επιφανειακούς δείκτες (π.χ CD44⁺/CD24^{-low}). Μαμμόσφαιρες μπορούν να σχηματιστούν και στα φυσιολογικά κύτταρα μαστού, αλλά είναι κατά πολύ μικρότερες και αντικατοπτρίζουν τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα μαστού. Η EMT, η παραγωγή μαμμοσφαιρών και ο καρκίνος αποτελούν τρεις έννοιες που συνδέονται μεταξύ τους όπως έχει αποδειχθεί σε

ανθρώπινα μετασχηματισμένα κύτταρα μαστού (Mani et al, 2008) και όγκους καρκίνου μαστού (Wright et al, 2008) καθώς ο επαγόμενος από EMT φαινότυπος χαρακτηρίζεται από ένα υποπληθυσμό κυττάρων με φαινότυπο $CD24^{-low}/CD44^{+}$ και με αυξημένη ικανότητα σχηματισμού μαμμοσφαιρών. Ακόμη, οι μαμμόσφαιρες έχουν χαρακτηριστεί ως αδιαφοροποίητα βλαστικά/προγονικά κύτταρα, αφού κατέχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης στους τρεις ιστοειδικούς τύπους του μαστικού αδένα (κύτταρα αυλού, μυοεπιθηλιακά και κυψελιδωτά κύτταρα) (251, 253). Επίσης, τα κύτταρα των μαμμοσφαιρών πέραν του φαινοτύπου $CD24^{low}/CD44^{high}$ εκφράζουν και τον χαρακτηριστικό δείκτη των βλαστικών κυττάρων, Oct4 (251).

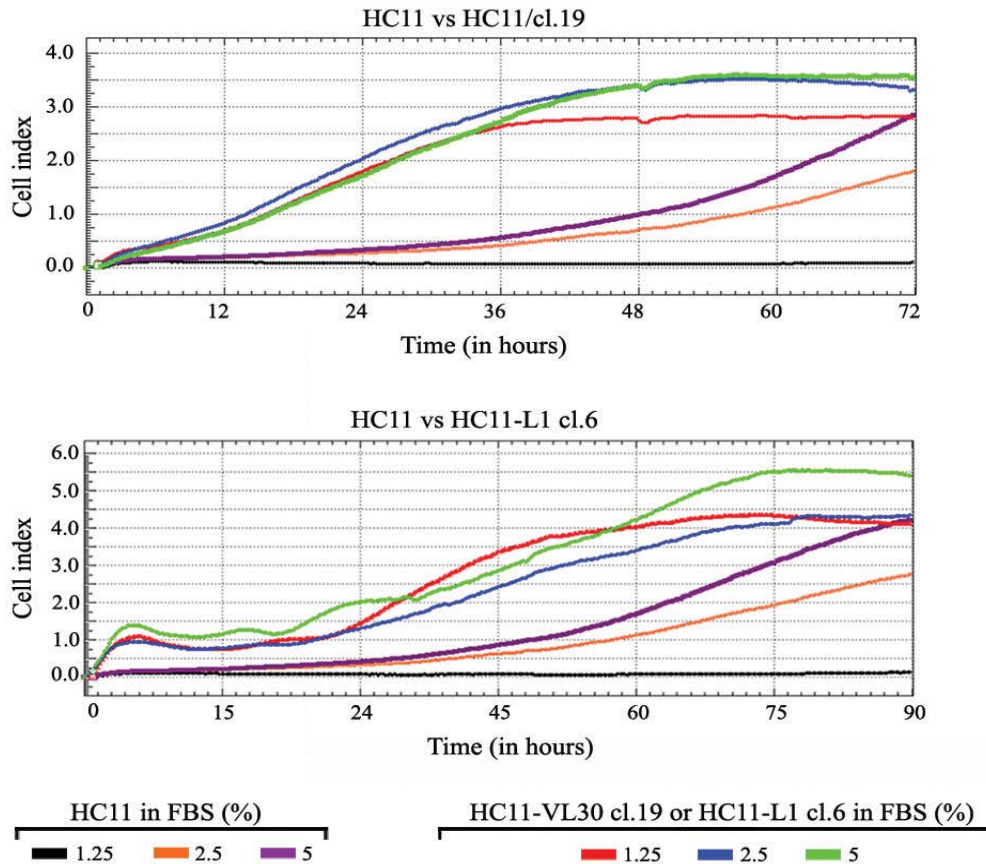
Έχοντας υπόψη ότι δεν έχουν όλα τα καρκινικά κύτταρα μέσα σε ένα όγκο την ικανότητα να αναπαράγουν νέους όγκους, στα ακόλουθα πειράματα εξετάσαμε εάν τα μετασχηματισμένα από ρετρομετάθεση κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 έχουν αποκτήσει ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων και την ικανότητα σχηματισμού μαμμοσφαιρών υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης.

3.3.1 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-LINE παρουσιάζουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων

Προηγούμενες μελέτες έχουν συσχετίσει την μετάπτωση EMT με την απόκτηση ιδιοτήτων επιθηλιακών βλαστικών κυττάρων (Mani et al, 2008). Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα εξετάσαμε την περίπτωση τα θετικά ρετρομετάθεσης και με επαγμένη EMT κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, να έχουν αποκτήσει ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Για να προσεγγίσουμε το ερώτημα αυτό, αρχικά μελετήσαμε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 και HC11-L1 σε χαμηλή συγκέντρωση ορού, με τη χρήση του αναλυτή RTCA DP (real-time cell analysis). 5.000 κανονικά κύτταρα HC11, ως μάρτυρας, και αντίστοιχα κυττάρων από δύο (2) κλώνους, ανά περίπτωση-θετικών ρετρομετάθεσης VL30 ή L1 με πιστοποιημένη EMT, αναπτύχθηκαν σε ειδικά πολυτρυβλία (e-plates) για 4 ημέρες και σε συγκέντρωση ορού 5-, 2.5- και 1.25%. Η κυτταρική ανάπτυξη στοιχειοθετήθηκε αυτόματα από τον αναλυτή, μετρώντας τον αριθμό κυττάρων ανά μονάδα χρόνου και συγκέντρωση ορού, με την

κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης (growth curves) κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων και μαρτύρων HC11. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων αναγράφεται το Cell Index (CI), που αντιστοιχεί σε μια ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στην μονάδα του χρόνου. Αλλαγές στην κατάσταση των κυττάρων, όπως η μορφολογία, η κυτταρική βιωσιμότητα ή κυτταρική προσκόλληση επηρεάζουν επίσης το CI.



Εικόνα 3.15: Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 αναπτύσσονται υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού. Απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των επιθηλιακών κυττάρων-μαρτύρων HC11 και αντίστοιχων κυττάρων κλώνων, θετικών ρετρομετάθεσης VL30 και L1 με πιστοποιημένη EMT. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικά πολυτρυβλία (e-plates) για 4 ημέρες και σε συγκέντρωση ορού 10-, 5-, 2.5- και 1.25%. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική RTCADP-XCelligence για την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης (growth curves).

Στην Εικόνα 3.15 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης σε διάφορες συγκεντρώσεις ορού για τους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους HC11-VL30 Cl.19 και HC11-L1 Cl.6, συγκριτικά με αυτές των κυττάρων μαρτύρων HC11. Η πρώτη σημαντική

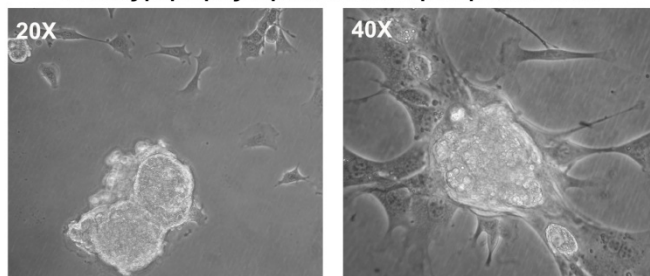
παρατήρηση ήταν ότι τα κύτταρα-μάρτυρες HC11 παρουσιάζουν καλύτερο προφίλ ανάπτυξης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση ορού στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης, όπως και αναμενόταν, ενώ δεν αναπτύσσονται σε συνθήκες ελάχιστης συγκέντρωσης ορού (1.25%). Αντίθετα, τα κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 παρουσιάζουν ένα παρόμοιο προφίλ αλλά υψηλότερης ανάπτυξης σε όλες τις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.15 Β). Συγκεκριμένα στις 48 ώρες και στην ελάχιστη συγκέντρωση ορού 1.25%, τα κύτταρα μάρτυρες HC11 δεν αναπτύσσονται σε αντίθεση με τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30, τα οποία στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή είχαν cell index 2.8 και τα κύτταρα HC11-L1 cell index 3.8. (Εικόνα 3.13 Α). Επίσης, στις 48 ώρες το cell index των κυττάρων μαρτύρων HC11 με συγκέντρωση ορού 2.5% και 5% ήταν 0.75 και 1.0, ενώ τα αντίστοιχα cell index των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων ήταν κατά πολύ υψηλότερες, της τάξεως του 3.46 για τα κύτταρα HC11-VL30 Cl.19 και 2.8 και 3 αντίστοιχα στην περίπτωση των κυττάρων HC11-L1 Cl.6.

Η ικανότητα ανάπτυξης των κυττάρων-κλώνων υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού, βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί ένα επιπλέον τεκμήριο για την εμφάνιση καρκινικών ιδιοτήτων στα θετικά ρετρομετάθεσης VL30 & L1 κύτταρα.

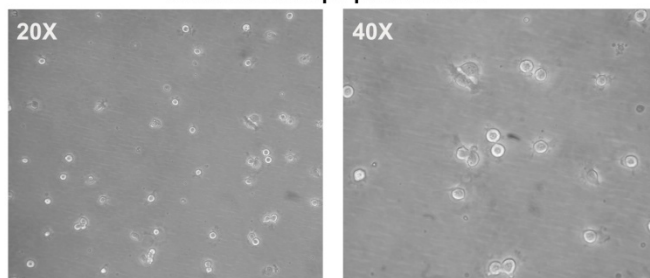
3.3.2 Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης VL30 και LINE-1 με το σχηματισμό μαμμοσφαιρών υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11

Βασισμένοι στα παραπάνω αποτελέσματα, θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν τα μετασχηματισμένα κύτταρα κλώνων, που είναι θετικά σε ρετρομετάθεση VL30 ή LINE-1 και με πιστοποιημένη EMT, ήταν ικανά: (α) να αναπτύσσονται ανεξάρτητα προσκόλλησης ή (β) ήταν ανθεκτικά-απόπτωσης και επιπλέον (γ) εάν ήταν ικανά να σχηματίζουν μαμμόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης.

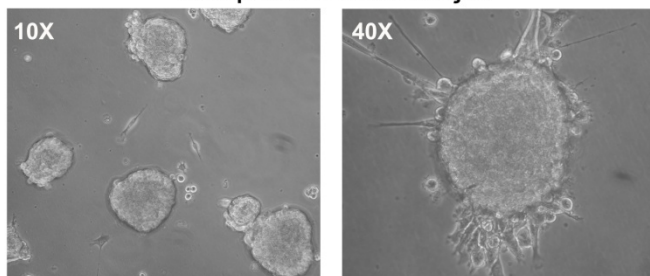
Θετικός μάρτυρας καρκινικών κυττάρων μαστού C127



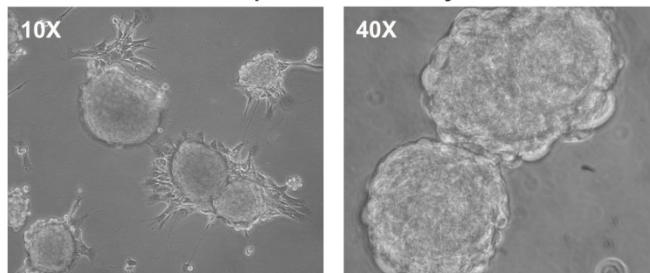
Κανονικά κύτταρα μαστού HC11



Κύτταρα HC11-VL30 κλώνος 12



Κύτταρα HC11-L1 κλώνος 1



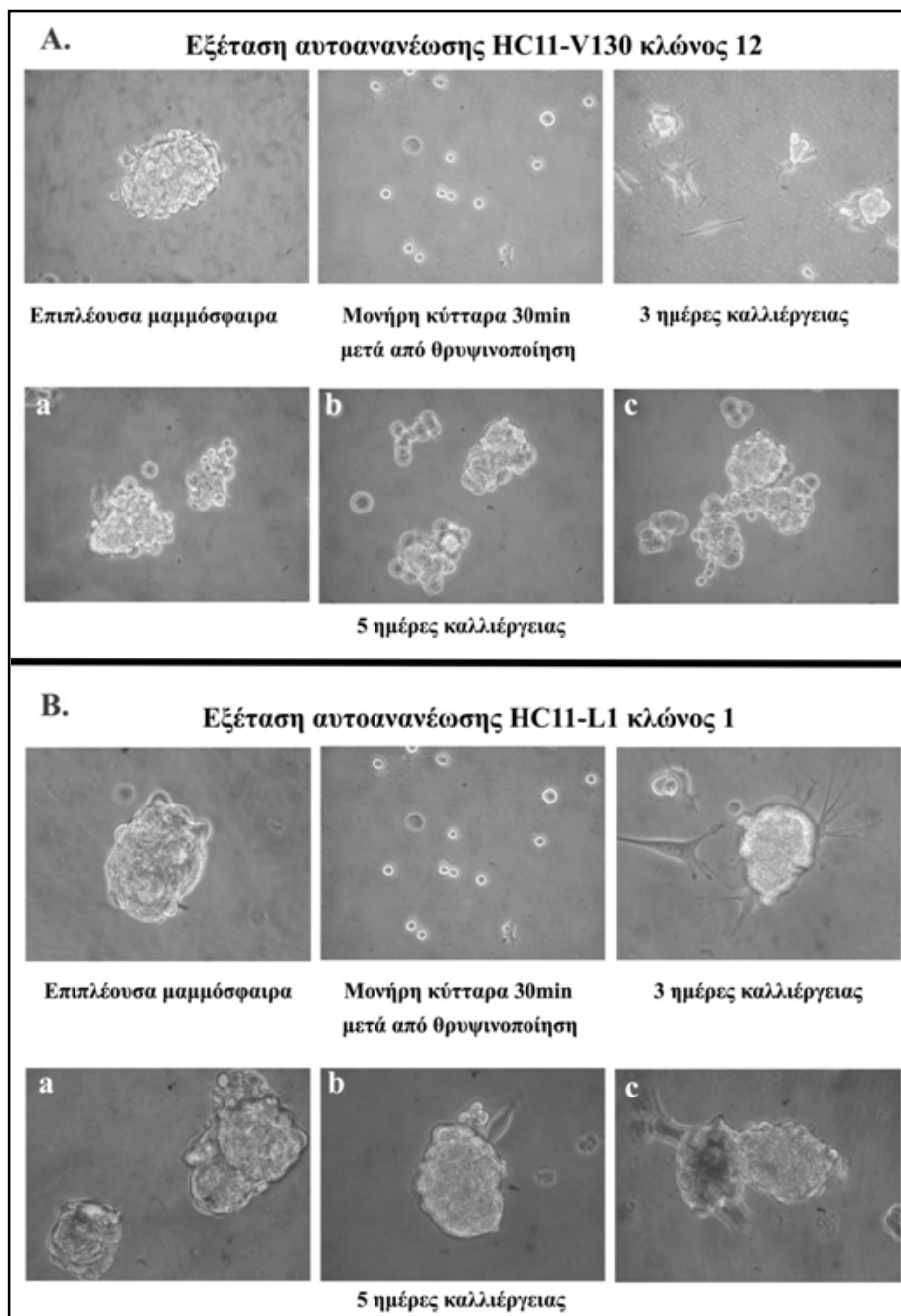
Εικόνα 3.16: Κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 σχηματίζουν μαμμόσφαιρες μεγάλου μεγέθους υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης. Κύτταρα C127, ως θετικός μάρτυρας καρκινικών κυττάρων ικανών να σχηματίζουν μαμμόσφαιρες, κύτταρα HC11, ως αρνητικός μάρτυρας καθώς και θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα από τους κλώνους HC11-VL30 (cl. 3, 6, 9, 10, 11, 12, 19) & κλώνων HC11-L1 (cl. 1, 2, 4, 6 και 10), αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία. Παρουσιάζονται οι: HC11-VL30 κλώνος 12 και HC11-L1 κλώνος 1 ως αντιπροσωπευτικοί κλώνοι του πειράματος. Οι καλλιέργειες φωτογραφήθηκαν μετά από 5 ημέρες σε μεγένθυση 10- και 20X και 40X.

Προκειμένου να εξεταστεί η υπόθεση αυτή, οι κλώνοι HC11-VL30 (cl. 3, 6, 9, 10, 11, 12, 19) και HC11-L1 (cl. 1, 2, 4, 6 και 10), αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε τρυβλία μειωμένης προσκόλλησης (βακτηριακά τρυβλία Petri), τα οποία στερούνται κατάλληλου υλικού κυτταρικής προσκόλλησης χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα κανονικά κύτταρα HC11 και ως θετικό μάρτυρα τα καρκινικά κύτταρα μαστού C127. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.16, τα κύτταρα C127 παράγουν μαμμόσφαιρες, όπως αναμενόταν λόγω του καρκινικού χαρακτήρα τους. Αντίθετα, τα κύτταρα-μάρτυρες HC11 δεν σχηματίζουν μαμμόσφαιρες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι εξετασθέντες κλώνοι HC11-VL30 και HC11-L1 σχηματίζουν μαμμόσφαιρες ακόμη και από την 2^η ημέρα ανάπτυξης των υποστηρίζοντας α. την ανθεκτικότητά ανάπτυξής τους σε συνθήκες μειωμένης κυτταρικής πρόσφυσης (Apoikis) που αποτελεί έλεγχο/τεστ διάγνωσης κυτταρικού καρκινικού χαρακτήρα και β. την ικανότητά τους να παράγουν καρκινικά βλαστικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα των κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 σχηματίζουν μαμμόσφαιρες, υπό συνθήκες ελαττωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. Με βάση το ότι οι μαμμόσφαιρες αποτελούνται από κύτταρα με ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων, τα ανωτέρω δεδομένα αποτελούν μια πρώτη ισχυρή ένδειξη συσχέτισης της ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30 και L1 με την επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε προγονικά κύτταρα μαστού ποντικού HC11.

3.3.3 Οι θετικές σε ρετρομετάθεση μαμμόσφαιρες HC11-VL30 και HC11-L1 έχουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων

Μία βασική ιδιότητα των κανονικών αλλά και των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι η ικανότητα αυτοανανέωσης (*self-renewal*). Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα αυτοανανέωσης των παραγόμενων μαμμόσφαιρων και κατ' επέκταση να εξακριβωθεί εάν πρόκειται για κύτταρα με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων ακολουθήσαμε δύο προσεγγίσεις.

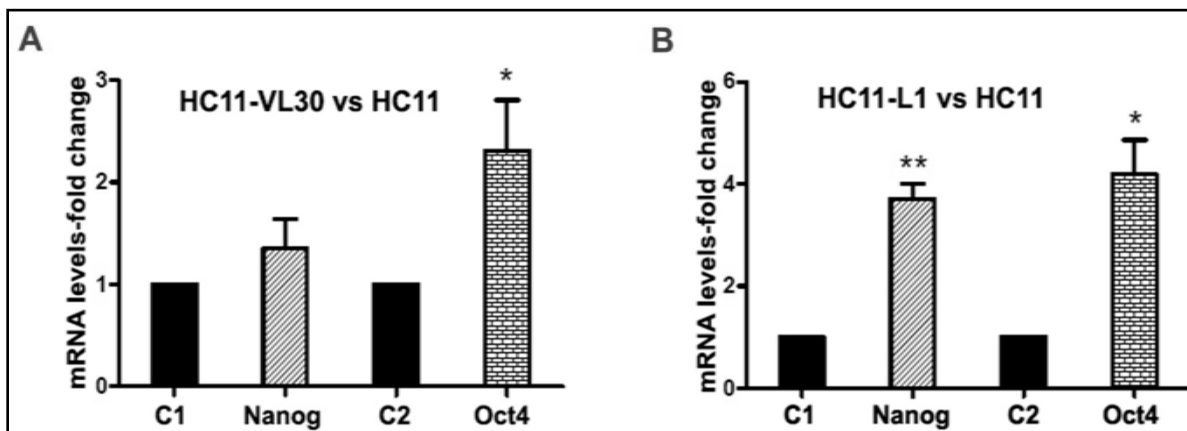


Εικόνα 3.17: Οι πρωτογενείς μαμμόσφαιρες θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 αυτοανανεώνονται. Επιπλεύουσες πρωτογενείς μαμμόσφαιρες κυττάρων HC11-VL30 (A) και HC11-L1 (B) θρυψινοποιήθηκαν και αφέθηκαν για ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία, ως μονήρη κύτταρα. Για κάθε περίπτωση κυττάρων (A ή B) παρουσιάζονται, πάνω αριστερά: επιπλεύουσα μαμμόσφαιρα, πάνω κεντρικά: θρυψινοποιημένα μονήρη κύτταρα 30 λεπτά μετά από την μεταφορά των σε βακτηριακά τρυβλία, πάνω δεξιά: δευτερογενείς μαμμόσφαιρες μετά από 3 μέρες καλλιέργειας, κάτω a, b και c: αναπτυσσόμενες μαμμόσφαιρες μετά από 5 μέρες καλλιέργειας.

Πρώτον, το σύνολο των επιπλέοντων μαμμόσφαιρων συλλέχθηκε μαζί με το υπερκείμενο και μεταφέρθηκε προς ανάπτυξη σε κανονικές πλαστικές φιάλες. Οι μαμμόσφαιρες αναπτύχθηκαν και τα κύτταρα απέκτησαν και πάλι την μεσεγχυματική τους μορφολογία. Στην συνέχεια οι καλλιέργειες κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 τρυψινοποιήθηκαν πλήρως και ως μονήρη κύτταρα, μεταφέρθηκαν σε βακτηριακά τρυβλία όπου και παρατηρήθηκε ότι επανασηματίζονται μαμμόσφαιρες. Με μία άλλη διαδικασία, συλλέξαμε το υπερκείμενο με τις επιπλεύουσες μαμμόσφαιρες και ακολούθησε θρυψινοποίηση προκειμένου να προκύψουν μονήρη κύτταρα. Και στις δύο περιπτώσεις θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 ή HC11-L1, μετά το πέρας 30 λεπτών από την μεταφορά των κυτταρικών εναιωρημάτων σε βακτηριακά τρυβλία, τα μονήρη κύτταρα φωτογραφήθηκαν και η εξέλιξη ανάπτυξης των κυττάρων παρακολούθηθηκε με μικροσκόπιο φωτογραφίζοντας στην 3^η και 5^η μέρα της καλλιέργειάς τους.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.17, παρατηρώντας την εξέλιξη ανάπτυξης των κυττάρων, προκύπτει ότι οι μαμμόσφαιρες επανασηματίζονται και στις δύο περιπτώσεις κυττάρων κλώνων HC11-VL30 ή HC11-L1. Ο επανασηματισμός δε αυτός ήταν σχετικά γρήγορος δεδομένου ότι παρατηρήθηκαν μικρές δευτερογενείς μαμμόσφαιρες 3 ημέρες μετά την καλλιέργεια, γεγονός που υποστηρίζει ότι οι μαμμόσφαιρες έχουν την ικανότητα και ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων να αυτοανανεώνονται.

Σε ένα επόμενο στάδιο εξετάσαμε με τη βοήθεια της τεχνικής Real-Time PCR την έκφραση mRNA των γονιδίων βλαστικότητας Nanog και Oct4 σε απομονωμένα κύτταρα μαμμοσφαιρών θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες HC11. Στην περίπτωση των κυττάρων HC11-VL30 παρατηρήσαμε επαγωγή της mRNA έκφρασης του γονιδίου Oct4 κατά ~2.4 φορές, ενώ η μικρή μεταβολή στην έκφραση mRNA του Nanog δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.18 A). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι στην περίπτωση των κυττάρων HC11-L1 σημειώθηκε αύξηση τόσο των επιπέδων έκφρασης mRNA του γονιδίου Oct4 κατά ~4.3 φορές όσο και του γονιδίου Nanog κατά ~ 3.7 φορές συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικόνα 3.18 B).



Εικόνα 3.18: Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης VL30 και LINE-1 (L1) με την αύξηση της mRNA έκφρασης των γονιδίων Oct4 και Nanog. (A) Η ρετρομετάθεση VL30 επάγει την μεταγραφική έκφραση του δείκτη βλαστικών κυττάρων Oct4, ενώ η μεταβολή στην έκφραση mRNA του Nanog δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική. (B) Αξιοσημείωτα, η ρετρομετάθεση LINE-1 οδηγεί στην επαγωγή τόσο του Oct4 όσο και του Nanog. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

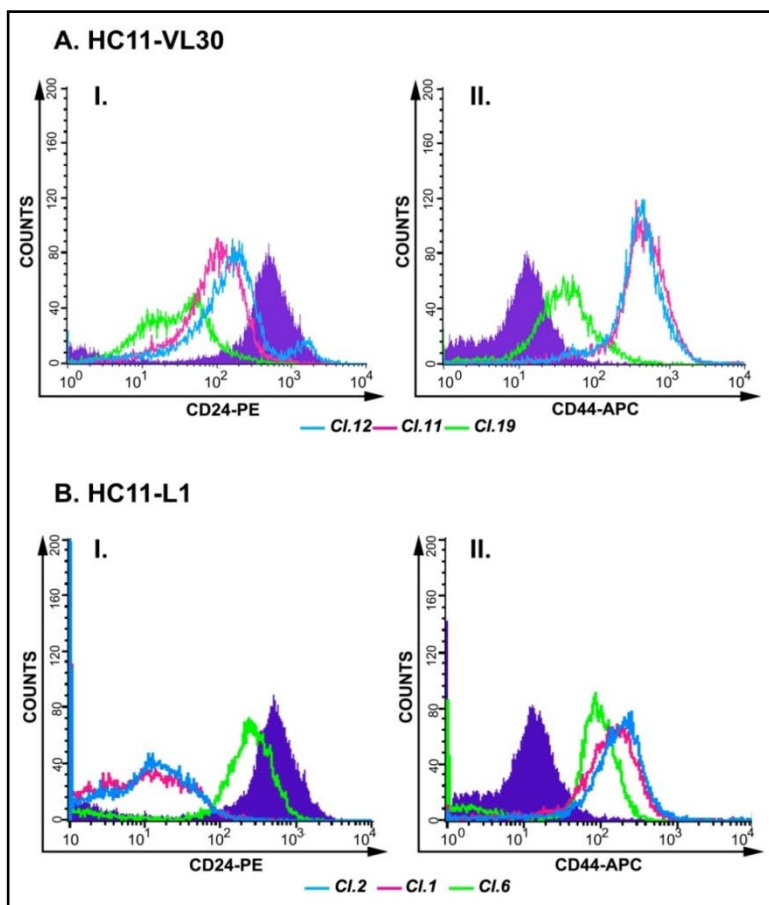
Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι θετικές σε ρετρομετάθεση VL30 και L1 μαμμόσφαιρες έχουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες HC11.

3.3.4 Κύτταρα απομονωμένων μαμμόσφαιρων HC11-VL30 και HC11-L1 εμφανίζουν μεταβολή έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD24/CD44

Πρόσφατες μελέτες από τον Al-Hajj και συνεργάτες (250) απέδειξαν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μαστού, ενοχοποιούμενα ως εναρκτήρια κύτταρα δημιουργίας καρκινικών όγκων, έχουν τον χαρακτηριστικό φαινότυπο επιφανειακών κυτταρικών αντιγόνων ως $CD24^{-low}/CD44^{high}$.

Προκειμένου να εξεταστεί εάν οι θετικές σε ρετρομετάθεση μαμμόσφαιρες αποτελούν καρκινικά βλαστικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD24 και CD44 μέσω κυτταρομετρίας ροής. Χρησιμοποιήσαμε ειδικά αντισώματα έναντι των δεικτών αυτών σε κύτταρα απομονωμένων μαμμοσφαιρών, έπειτα από καλλιέργειά τους σε κανονικά σκεύη καλλιέργειας, από τρεις (3) κλώνους HC11-VL30 c1.11, c1.12 και c1.19 και από τρεις (3) κλώνους HC11-L1 c1.1, c1.2 και c1.6. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα επίπεδα έκφρασης CD24/CD44 κυττάρων-

μαρτύρων HC11. Παρατηρήθηκε ότι η ρετρομετάθεση VL30 και L1 συσχετίζεται με σημαντική μεταβολή στην έκφραση των προς μελέτη αντιγονικών δεικτών CD24/CD44 στα κύτταρα μαμμόσφαιρών κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.19). Συγκεκριμένα, και στους τρεις κλώνους που εξετάστηκαν ανά περίπτωση ρετροτρανσποζονίου VL30 ή L1, η έκφραση του CD24 μειώθηκε (Εικ. 19 A.I και B.II), ενώ η αντίστοιχη έκφραση του CD44 αυξήθηκε, συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων-μαρτύρων HC11 (Εικ. 19 A.II και B.II).



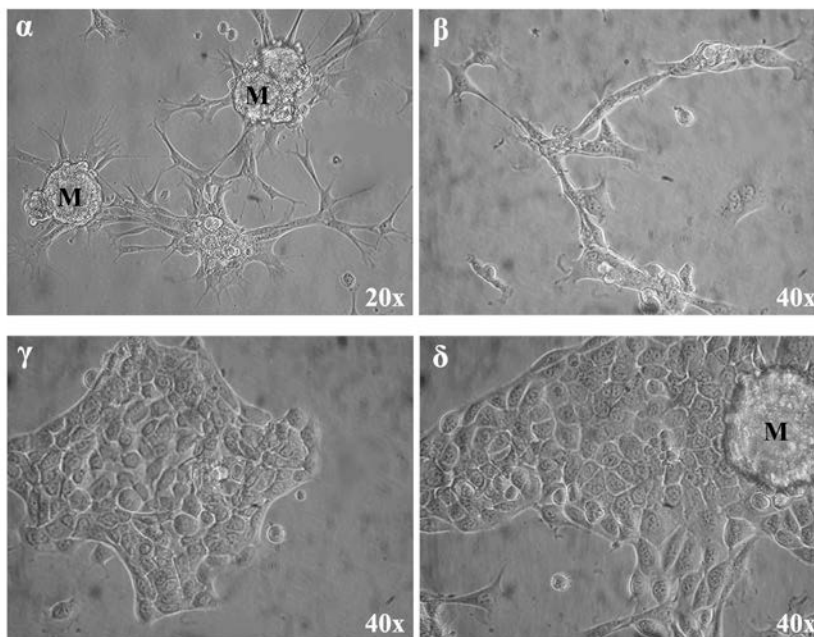
Εικόνα 3.19: Μεταβολή της αντιγονικής έκφρασης των δεικτών CD24/CD44 σε απομονωμένα από μαμμόσφαιρες κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1. 5×10^5 κύτταρα από απομονωμένες μαμμόσφαιρες τριών αντιπροσωπευτικών κλώνων HC11-VL30 cl.11, cl.12, cl.19 και HC11-L1 cl.1, cl.2, cl.6 και κύτταρα-μάρτυρες HC11, σημάνθηκαν με τα αντισώματα CD24 και CD44 και μετρήθηκε η έκφραση των αντίστοιχων αντιγονικών δεικτών με FACS. Παρουσιάζονται οι κατανομές φθορισμού μάρτυρα (ιώδης συμπαγής) και θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων (πράσινη, κόκκινη, μπλε) ως μία συνολική επικάλυψη. **A.I:** Προφίλ έκφρασης CD24 για τα κύτταρα HC11-VL30 vs HC11. **A.II:** Προφίλ έκφρασης CD44 για τα κύτταρα HC11-VL30 vs HC11. **B.I:** Προφίλ έκφρασης CD24 για τα κύτταρα HC11-L1 vs HC11. **B.II:** Προφίλ έκφρασης CD44 για τα κύτταρα HC11-L1 vs HC11.

Παρατηρούνται μεγάλα ποσοστά: τόσο μείωσης σε έκφραση CD24 όσο και αύξησης σε έκφραση CD44, γεγονός που μας οδήγησε στη διαπίστωση ότι τα προερχόμενα από μαμμόσφαιρες κύτταρα των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-VL30 ή HC11-L1, αναμφίβολα χαρακτηρίζονται ως CD24^{-low}/CD44^{+high} σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες HC11. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι τα γεγονότα ρετρομετάθεσης VL30 ή LINE-1 είναι ικανά να προκαλέσουν την επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε προγονικά κύτταρα μαστού ποντικού HC11, στην πορεία μετάπτωσης EMT.

3.3.5 Οι θετικές σε ρετρομετάθεση VL30 και LINE-1 μαμμόσφαιρες διαφοροποιούνται σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους

Όπως έχει προαναφερθεί οι μαμμόσφαιρες έχουν χαρακτηριστεί ως αδιαφοροποίητα βλαστικά/προγονικά κύτταρα, αφού κατέχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας αυτοανανέωσης αλλά και διαφοροποίησης στους τρεις ιστοειδικούς τύπους του μαστικού αδένα (κύτταρα αυλού, μυοεπιθηλιακά και κυψελιδωτά κύτταρα). Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός, πως κατά την συνεχή καλλιέργεια των κυττάρων του κλώνου HC11-VL30 cl.12 για 20 ημέρες, σε συνθήκες ελαττωμένης προσκόλλησης σε βακτηριακά τρυβλία, παρατηρήθηκε κυτταρική διαφοροποίηση όπως πιστοποιήθηκε με την εμφάνιση διακριτών κυτταρικών τύπων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.20, ως πρώτη διαπίστωση, παρατηρούνται κύτταρα μεσεγχυματικής μορφολογίας τα οποία με την πάροδο του χρόνου οδηγούνται στη γένεση άλλων διακριτών κυτταρικών τύπων. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα μαμμοσφαιρών πέραν της ικανότητας αυτοανανέωσης είχαν την ικανότητα να σχηματίζουν κυτταρικές δομές αποτελούμενες από τουλάχιστον δύο στρώματα κυττάρων, γεγονός που μας κέντρισε το ενδιαφέρον να διερευνήσουμε εάν τα δύο αυτά στρώματα συμπίπτουν μορφολογικά με τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν τα κυψελιδωτά κύτταρα του γαλακτοφόρου αδένα.

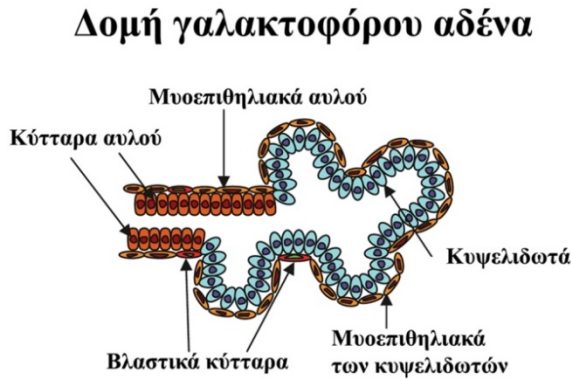
HC11-VL30 cl.12



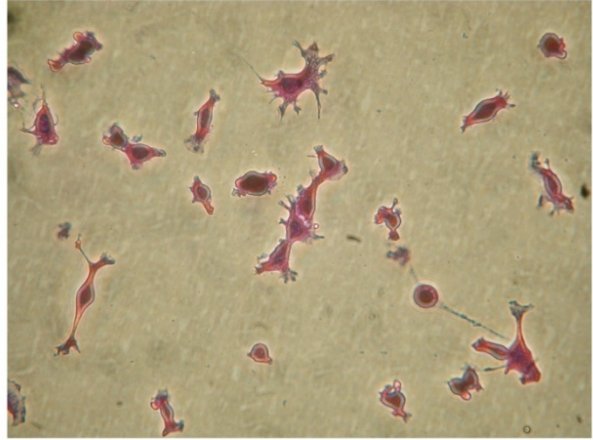
Εικόνα 3.20: Τα κύτταρα μαμμοσφαιρών του κλώνου HC11-VL30 cl.12 διαφοροποιούνται και σχηματίζουν δομές ομοιάζοντων μυοεπιθηλιακών και κυψελιδωτών κυττάρων υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης. Η καλλιέργεια κυττάρων μαμμοσφαιρών για 20 ημέρες υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης οδήγησε στη γένεση μεσεγχυματικών κυττάρων (α, β), τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν περαιτέρω σχηματίζοντας κυτταρικές δομές αποτελούμενες από δύο στρώματα κυττάρων (γ, δ). M=Μαμμόσφαιρες

Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε εμφανέστερα τους κυτταρικούς τύπους, που παρατηρήσαμε βάψαμε τα κύτταρα του θετικού ρετρομετάθεσης κλώνου HC11-VL30 cl.12 με διάλυμα αιματοξυλίνης (Εικόνα 3.21). Με πρώτη παρατήρηση, διαπιστώθηκε η παρουσία κυττάρων ενδιάμεσου επιθηλιακού/μεσεγχυματικού φαινότυπου που πιστοποιούνται από κυλινδρική επιθηλιακή μορφολογία παραπέμποντας στα κύτταρα του αυλού του μαστού, παρουσιάζοντας πολικότητα αλλά επίσης και τα χαρακτηριστικά φιλοπόδια των μεσεγχυματικών κυττάρων. Επίσης παρατηρήθηκαν δύο άλλοι κυτταρικοί τύποι: ένας πολυπληθέστερος αλλά μικρότερου μεγέθους και ένας άλλος που τον περιβάλλει χαρακτηριζόμενος από ιδιαίτερα επιμήκη κύτταρα, που πιστεύουμε ότι αντιστοιχούν στα κυψελιδωτά κύτταρα και στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα του γαλακτοφόρου αδένου αντίστοιχα. Επιπλέον, τα παραγόμενα από τις μαμμόσφαιρες

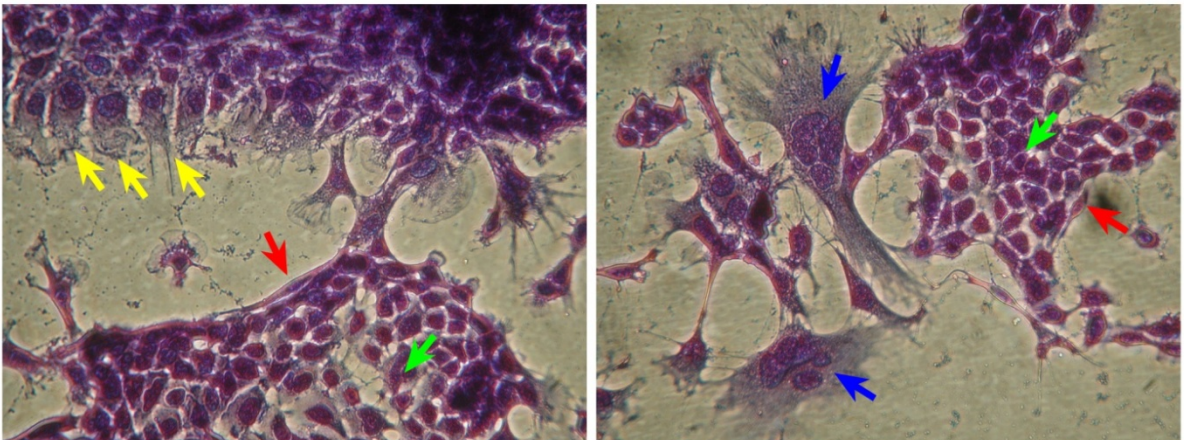
κύτταρα μπορούν να χαρακτηρισθούν μάλλον ως γενετικά ασταθή λόγω του ότι έφεραν στοιχεία πολυπλοειδίας με την παρουσία πολλαπλών πυρήνων.



HC11-control

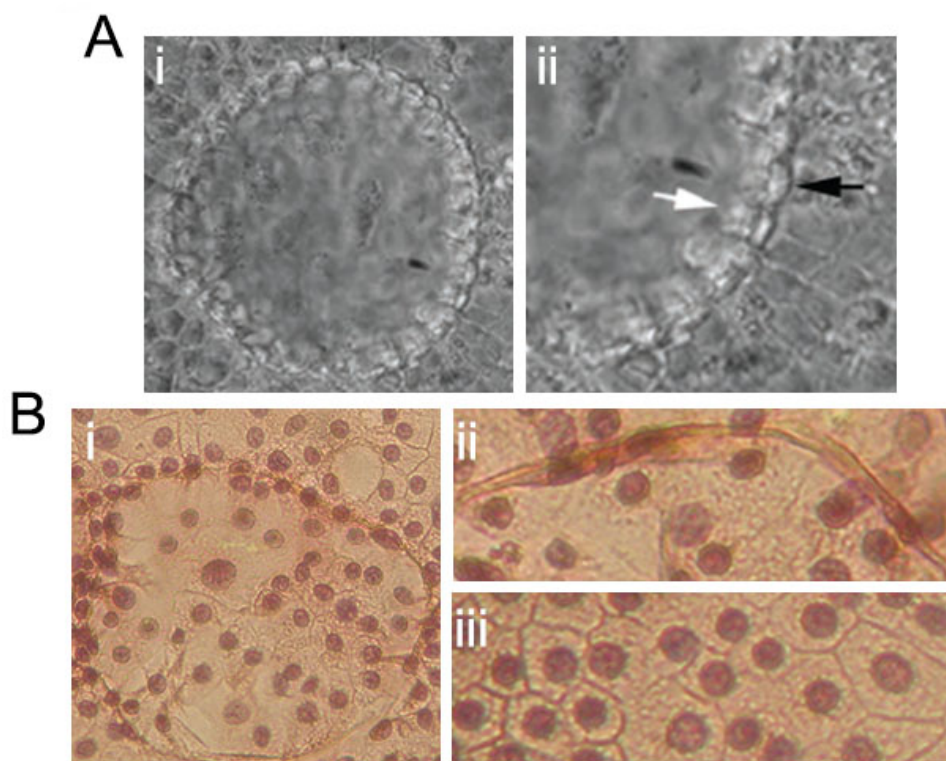


HC11-VL30 cl.12



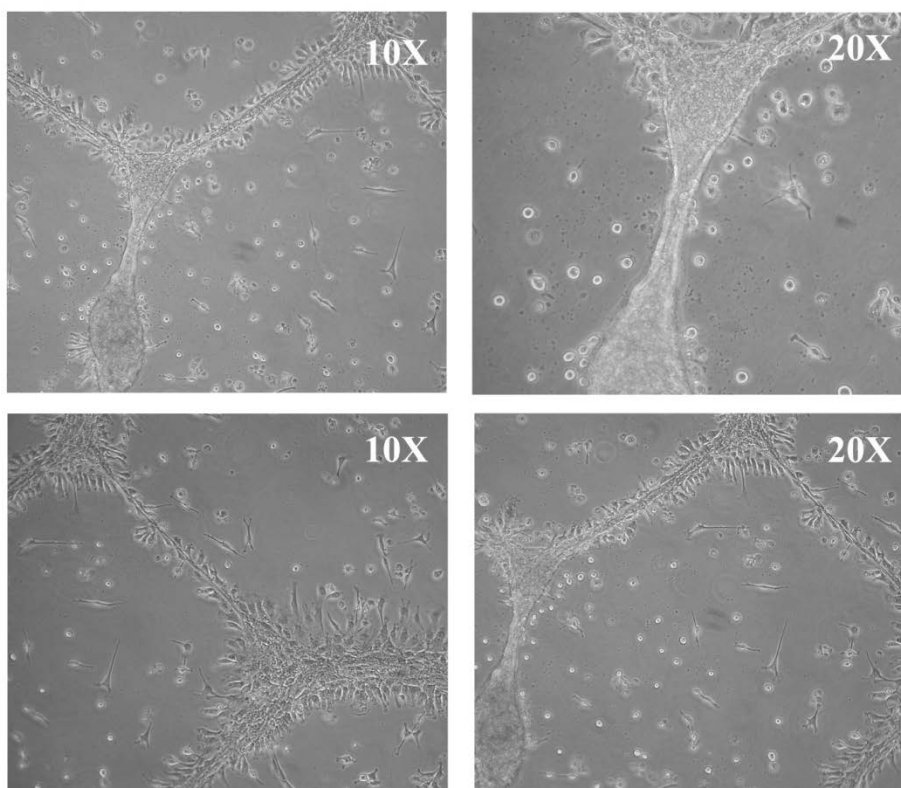
Εικόνα 3.21: Τυπικοί κυτταρικοί τύποι που εμφανίζονται κατά την ανάπτυξη κυττάρων του κλώνου HC11-VL30 cl.12 υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης, έπειτα από χρώση με αιματοξυλίνη. Κύτταρα HC11-VL30 cl.12 μετά από ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία για 20 ημέρες, μονιμοποιήθηκαν, χρώστηκαν με διάλυμα αιματοξυλίνης και φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 40X. Στα κύτταρα-μάρτυρες HC11 δεν παρατηρούνται τα ίδια φαινόμενα (πάνω Εικόνα δεξιά). Τα μπλε βέλη δείχνουν πολυπύρηννα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα κίτρινα βέλη κύτταρα ενδιάμεσης επιθηλιακής/μεσεγχυματικής μορφολογίας με επιθηλιακά χαρακτηριστικά (κυλινδρικό σχήμα, πολικότητα) και μεσεγχυματικά (πλεοπόδια). Τα κόκκινα βέλη δείχνουν κύτταρα που θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως μυοεπιθηλιακά, τα οποία περικυκλώνουν στο εσωτερικό τους ένα διαφορετικής μορφολογίας στρώμα κυττάρων (πράσινα βέλη).

Ακόμη, συμπληρωματικά με τις ανωτέρω παρατηρήσεις, έπειτα από καλλιέργεια του κλώνου HC11-VL30 cl.19 σε κανονικά πλαστικά τρυβλία, για 15-20 ημέρες παρατηρήθηκε η δημιουργία δομών κυττάρων αποτελούμενων από δυο διακριτούς κυτταρικούς τύπους. Για να μελετήσουμε περισσότερο μορφολογικά τις δομές αυτές πραγματοποιήσαμε χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.20 οι σχηματιζόμενες δομές απαρτίζονται από: **α.** ένα εξωτερικό στρώμα κυττάρων ομοιάζοντα με τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα μαστού, που περιβάλλει και **β.** ένα εσωτερικό στρώμα κυττάρων, το οποίο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ότι συνίσταται από επιθηλιακής προελεύσεως κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τέτοιου είδους δομές παρατηρήθηκαν μόνο στην περίπτωση ρετρομετάθεσης VL30 σε κύτταρα HC11. Οι δομές αυτές δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-L1.



Εικόνα 3.22: Διάκριση κυτταρικών τύπων σε κύτταρα HC11-VL30 CL.19 με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης. (A) Κύτταρα HC11-VL30 cl.19 καλλιιεργήθηκαν παρατεταμένα για 20 ημέρες σε κανονικά πλαστικά τρυβλία. Μαύρο βέλος: εξωτερικό στρώμα κυττάρων, άσπρο βέλος: εσωτερικό στρώμα κυττάρων. (B) Οι παραγόμενες κυτταρικές δομές μονιμοποιήθηκαν και χρώστηκαν με διάλυμα αιματοξυλίνης/εωσίνης. (Bi) Χρωσμένες κυτταρικές δομές. (Bii) Εξωτερικό κυτταρικό στρώμα ομοιάζοντων μυοεπιθηλιακών κυττάρων. (Biii) Εσωτερικό στρώμα κυττάρων επιθηλιακού τύπου.

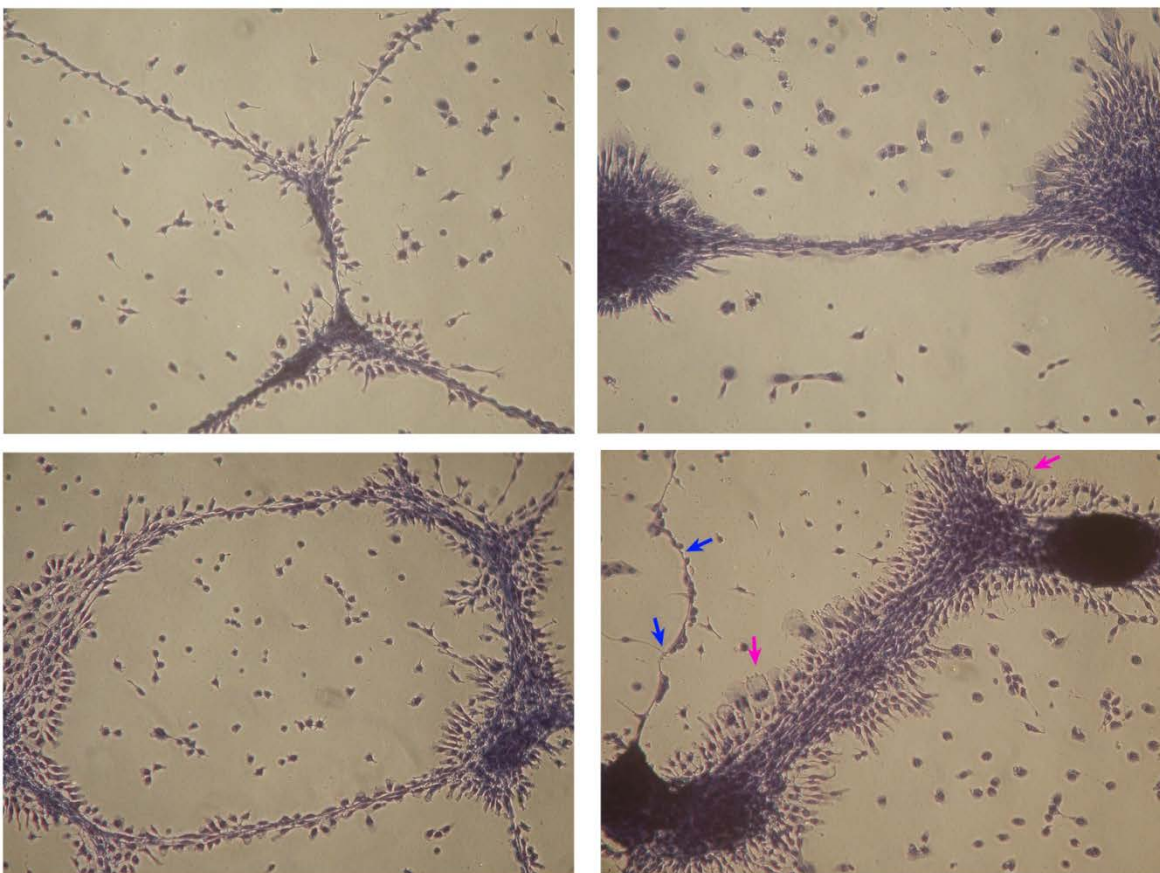
Όσον αφορά την περίπτωση των κυττάρων μαμμοσφαιρών HC11-L1, υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης παρατηρήθηκε επίσης ικανότητα διαφοροποίησής των προς μεσεγχυματικά κύτταρα. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα επίσης διαφοροποιούνται σχηματίζοντας δομές μεταξύ τους. Οι δομές αυτές διέφεραν μορφολογικά από τις δομές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των θετικών ρετρομετάθεσης VL30 κυττάρων (HC11-VL30). Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν δομές αποτελούμενες από δύο στρώσεις κυττάρων όπως στην περίπτωση των θετικών ρετρομετάθεσης VL30 κυττάρων (HC11-VL30). Εντούτοις, τα διαφοροποιημένα κύτταρα HC11-L1 εμφανίζονται να λαμβάνουν *in vitro* μια συγκεκριμένη χωροταξία, σχηματίζοντας δίκτυα κυτταρικών δομών (Εικόνα 3.23).



Εικόνα 3.23: Τα κύτταρα μαμμοσφαιρών του κλώνου HC11-L1 cl.6 διαφοροποιούνται και σχηματίζουν δομές δικτύων υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης. Κύτταρα HC11-L1 cl.6 καλλιεργήθηκαν σε μέσο μειωμένης προσκόλλησης (βακτηριακά τρυβλία) για 20 ημέρες. Παρατηρούνται ιδιαίτερες δομές κυτταρικής ανάπτυξης που φωτογραφήθηκαν με μεγέθυνση 10X και 20X.

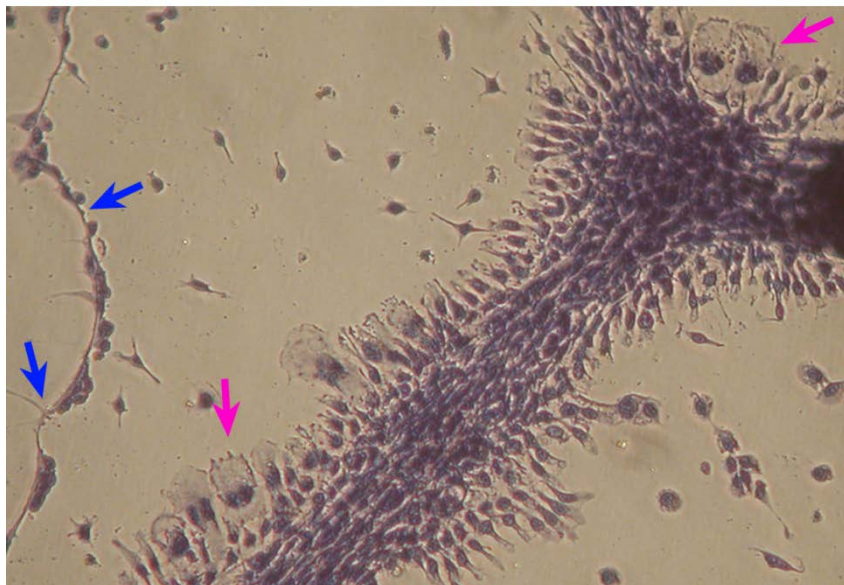
Με σκοπό να διακρίνουμε καλύτερα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των θετικών ρετρομετάθεσης HC11-L1 κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης-εωζίνης. Η

μορφολογική παρατήρηση μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός αυτών των δομών απαρτίζεται κυρίως από μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν μεταξύ τους δίκτυα θυμίζοντας συνάψεις κυττάρων και σε ένα λιγότερο ποσοστό από επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 3.24 & 3.25).



Εικόνα 3.24: Τοπικοί κυτταρικοί τύποι που εμφανίζονται κατά την ανάπτυξη κυττάρων του κλώνου HC11-L1 cl.6 υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης, έπειτα από χρώση με αιματοξυλίνη. Κύτταρα HC11-L1 cl.6 μετά από ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία για 20 ημέρες, μονιμοποιήθηκαν, χρώστηκαν με διάλυμα αιματοξυλίνης και φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 10X. Μπλε βέλη: κυτταρικές συνάψεις μεσεγχυματικών κυττάρων, ροζ βέλη: επιθηλιακά κύτταρα (βλέπε και Εικόνα 3.25).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30 και L1 στα προγονικά κύτταρα μαστού επάγει στην επαγωγή βλαστικών κυττάρων ικανών να διαφοροποιούνται σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους.



Εικόνα 3.25: Τοπικοί κυτταρικοί τύποι που εμφανίζονται κατά την ανάπτυξη κυττάρων του κλώνου HC11-L1 cl.6 υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης, έπειτα από χρώση με αιματοξυλίνη. Μεγέθυνση Εικόνας 3.24 μετά από ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία.. Μπλε βέλη: κυτταρικές συνάψεις μεσεγχυματικών κυττάρων, ροζ βέλη: επιθηλιακά κύτταρα.

3.4 Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης VL30 και LINE-1 σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11 με την επαγωγή καρκινογένεσης

Η ικανότητα διήθησης των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη κακοήθειας και η EMT αποτελεί κρίσιμο γεγονός για την ανάπτυξη διηθητικού δυναμικού. Τα κύτταρα που υφίστανται EMT χάνουν τις διακυτταρικές τους συνδέσεις και την πολικότητα τους, αυξάνεται η κινητικότητα τους και είναι πλέον ικανά να διηθήσουν τους γύρω ιστούς δια μέσου της εξωκυττάριας ουσίας-μήτρας (ECM) και να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένες θέσεις, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Η νεοπλασία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη λόγω αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και/ή μειωμένης απόπτωσης. Εάν το νεόπλασμα μεγαλώνει χωρίς να διηθεί το στρώμα και τους γειτονικούς ιστούς, πρόκειται για νεόπλασμα καλοήθους φύσεως και η νόσος είναι τοπική. Κακόηθες αποκαλείται το νεόπλασμα που μεγαλώνει διηθώντας το στρώμα του και τους γειτονικούς ιστούς αποκτώντας πρόσβαση σε λεμφαγγεία ή αιμοφόρα αγγεία, οπότε και αποκτά

μεταστατικό δυναμικό. Στην περίπτωση αυτή η νόσος είναι δυνητικά συστηματική και όχι μόνο τοπική.

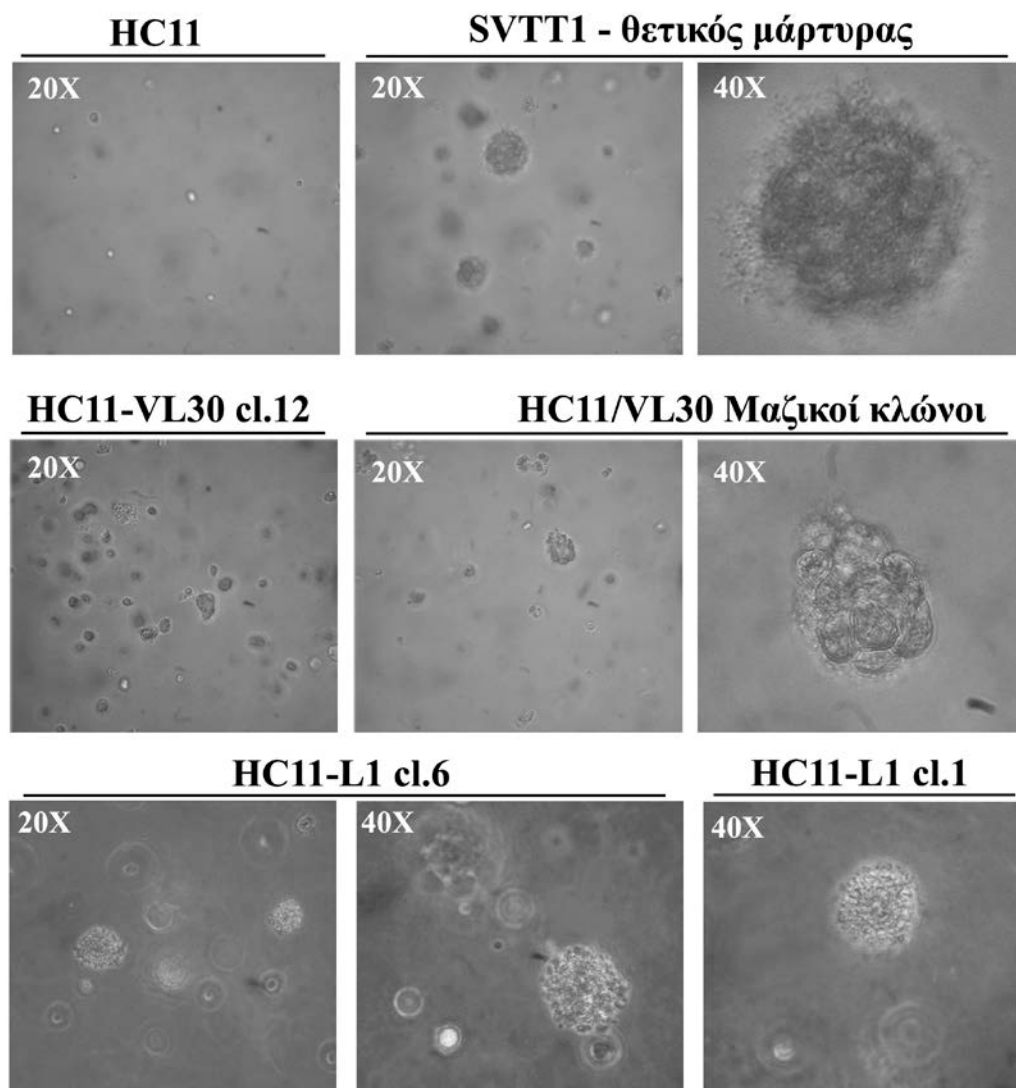
Μέσα από ένα μεγάλο πεδίο έρευνας έχει προσδιοριστεί ότι οι καρκινικοί όγκοι αποτελούν ετερογενείς οντότητες, όπου συγκεκριμένα μόνο ένας μικρός υποπληθυσμός των καρκινικών κυττάρων είναι ικανός να αναπτύσσεται σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα (249), προτείνοντας ένα ιεραρχικού τύπου μοντέλο καρκινογένεσης. Σε ανθρώπινους όγκους μαστού όπως προαναφέρθηκε έχει προσδιοριστεί η παρουσία ενός μικρού υποπληθυσμού καρκινικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν τον αντιγονικό φαινότυπο CD24^{low}/CD44^{high}. Αυτά τα κύτταρα είναι: εμπλουτισμένα σε κύτταρα έναρξης όγκου (tumor-initiating cells), συγκριτικά με την πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων φαινότυπου CD24^{high}/CD44^{low} στους ίδιους όγκους και επιπλέον έχουν την δυνατότητα να προκαλούν καρκινογένεση μετά από την εισαγωγή τους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια NOD/SCID (250).

3.4.1 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα έχουν την ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά μέσα.

Τα κανονικά κύτταρα για την επιβίωσή τους απαιτούν αναπτυξιακούς παράγοντες, κυτοκίνες και ορμόνες αλλά και άλλα ερεθίσματα όπως είναι τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Απουσία των σημάτων αυτών οδηγούνται σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και απόπτωση. Αντίθετα τα μετασχηματισμένα κύτταρα μπορούν και αναπτύσσονται σε ημιστερεά μέσα, απουσία προσκόλλησης, που αποτελεί ένα βασικό κριτήριο για την διαπίστωση κυτταρικού μετασχηματισμού.

Η επαγωγή EMT στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, καθώς και η ένδειξη αύξησης μεταστατικού δυναμικού, μας ώθησε να μελετήσουμε την δυνατότητα των κυττάρων αυτών να αναπτύσσουν εστίες (αποικίες) χωρίς υπόστρωμα προσκόλλησης (*anchorage-independent foci*). Η απόδειξη ότι τα θετικά σε ρετρομετάθεση και με πιστοποιημένη EMT κύτταρα είχαν την ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά μέσα θα αποτελούσε ένα πρώτο τεκμήριο σύνδεσης της επαγωγής ρετρομετάθεσης και καρκινικού χαρακτήρα σε κύτταρα μαστού ποντικού. Προκειμένου να ερευνησουμε το ενδεχόμενο αυτό, κύτταρα μαζικών και μονήρων κλώνων HC11-

VL30 ή HC11-L1 όπως και κύτταρα-μάρτυρες HC11, αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο αραρόζης συγκέντρωσης 0.6% για 16 ημέρες (Εικόνα 3.26). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η σταθερά μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά SVTT1, η οποία έχει μεταστατικό χαρακτήρα και προέρχεται από μόλυνση κυττάρων NIH3T3 με τον ιό SV40.



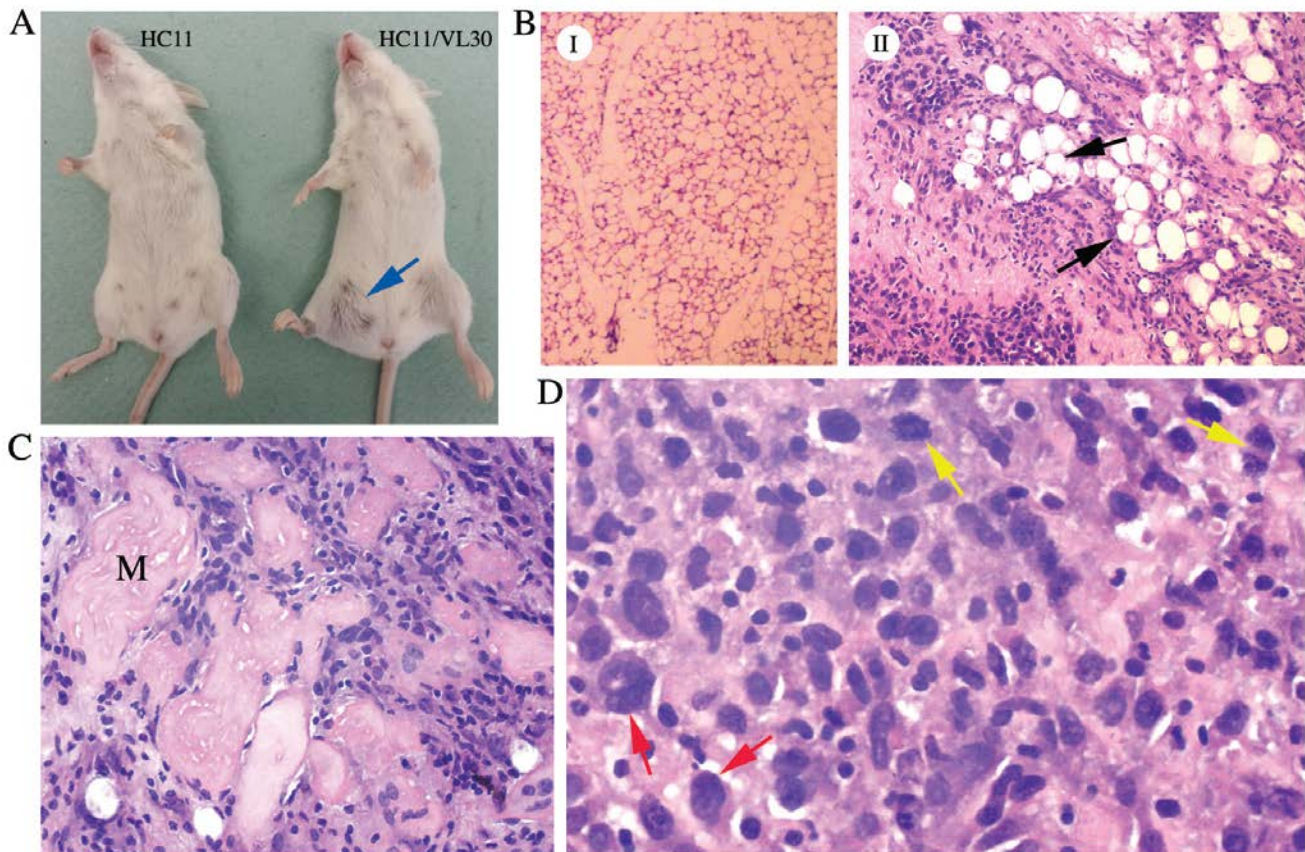
Εικόνα 3.26: Εξέταση της ικανότητας σχηματισμού εστιών κυττάρων (anchorage-independent foci) σε μονήρεις και μαζικούς κλώνους, θετικούς σε ρετρομετάθεση VL30. 400.000 κύτταρα, από κάθε περίπτωση κυττάρων θετικού μάρτυρα SVTT1, αρνητικού μάρτυρα HC11 και θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 cl.12, HC11-VL30 μαζικών κλώνων, HC11-L1 cl.1 & cl.6 αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 1X RPMI/10% FCS/0.6% αραρόζης για 16 ημέρες. Προηγουμένως είχε τοποθετηθεί βασική στοιβάδα αραρόζης. Οι καλλιέργειες φωτογραφήθηκαν σε μεγένθυση 20X και 40X.

Μετά το χρονικό διάστημα ανάπτυξης των κυττάρων για 16 ημέρες, παρατηρήθηκαν εστίες κυττάρων (Εικόνα 3.26) στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα SVTT1, όπως αναμενόταν. Επιπλέον αναπτύχθηκαν εστίες και στα προς μελέτη θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα τόσο των μαζικών όσο και των μονήρων κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 στις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Αντίθετα τα κύτταρα-μάρτυρες HC11, δεν ήταν ικανά να αναπτύξουν εστίες κυττάρων.

Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν επιπλέον μαρτυρία για τη συμβολή της ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30 και LINE-1 στο μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων HC11 και στην απόκτηση καρκινικών χαρακτηριστικών.

3.4.2 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-LINE είναι ικανά να παράγουν όγκους σε συγγενικά ποντίκια Balb/c

Δεδομένου ότι τα γεγονότα ρετρομετάθεσης (ως νέες γενωμικές ενσωματώσεις) θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην καρκινογένεση, διερευνήσαμε το ενδεχόμενο εάν τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 ή HC11-L1 είναι ικανά να παράγουν όγκους σε ποντίκια. Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήσαμε τα συγγενικά ποντίκια Balb/c (syngeneic mice), δηλαδή το ίδιο στέλεχος ποντικού από το οποίο απομονώθηκε η κυτταρική σειρά HC11. Δημιουργήσαμε τρεις ομάδες ποντικίων Balb/c, αποτελούμενες από επτά ποντίκια έκαστη και εφαρμόσαμε δύο πειραματικές προσεγγίσεις, σύμφωνα με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν ενέσεις **α.** 1×10^6 κυττάρων και **β.** 5×10^6 θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων μαζικών κλώνων HC11-VL30 ή HC11-L1 ή κανονικών κυττάρων μαρτύρων HC11. Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν στην κοιλιακή χώρα των ποντικίων δίπλα στον λιπώδη ιστό των μαστικών αδένων. Τα ποντίκια εξετάζονταν με ψηλάφηση στο σημείο της ένεσης κάθε τρεις ημέρες για την ανίχνευση νεοπλάσματος.

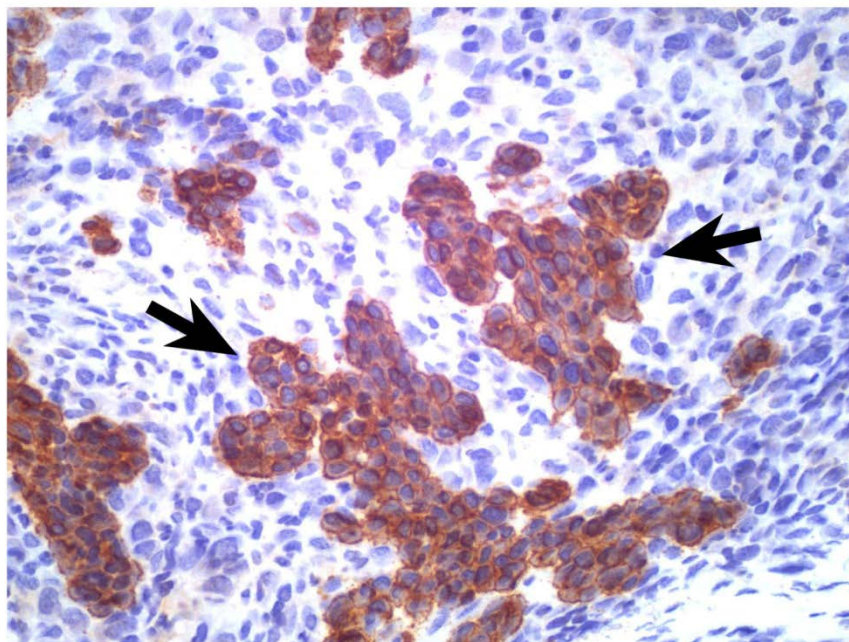


Εικόνα 3.27: Η ρετρομετάθεση των VL30 επάγει ογκογένεση σε ποντίκια Balb/c. (A) Παρουσιάζονται τα ποντίκια Balb/c που ενέθηκαν με 5×10^6 κυττάρων HC11 (αριστερά) και θετικών ρετρομετάθεσης μαζικών κλώνων HC11-VL30 (δεξιά). Το μπλε βέλος δείχνει τη θέση όπου έγιναν οι ενέσεις των κυττάρων και το αναπτυσσόμενο νεόπλασμα δίπλα στον μαστικό αδένα στην κοιλιακή χώρα του ζώου. (BI) τομή παραφίνης φυσιολογικού λιπώδους ιστού ζώου, έπειτα από χρώση αιματοξυλίνης/εωζίνης. (BII) Τα νεοπλασματικά κύτταρα διηθούν τον λιπώδη ιστό. Οι βαμμένοι μπλε πυρήνες αντιστοιχούν στα νεοπλασματικά κύτταρα. Τα μαύρα βέλη δείχνουν λιπώδη κύτταρα. (C) Τα καρκινικά κύτταρα διηθούν τον περιβάλλον μυικό ιστό (M). (D) Μεγαλύτερη μεγέθυνση τομών νεοπλάσματος. Κόκκινα βέλη: κύτταρα με ευμεγέθεις πυρήνες, πολλούς πυρηνίσκους και άφθονο κυτταρόπλασμα. Κίτρινα βέλη: κύτταρα εμφανίζουν μιτωτικά χαρακτηριστικά.

Σύμφωνα με τα πρώτα πειράματα στην περίπτωση της εισαγωγής 1×10^6 κυττάρων στα πειραματόζωα δεν παρατηρήσαμε όγκους σε καμία από τις τρεις ομάδες πειραματόζωων σε διάστημα τεσσάρων μηνών μετά την ένεση. Σε δεύτερο χρόνο έπειτα από ενέσεις 5×10^6 κυττάρων ανά περίπτωση παρατηρήσαμε τα εξής: 1. νεοπλασματική

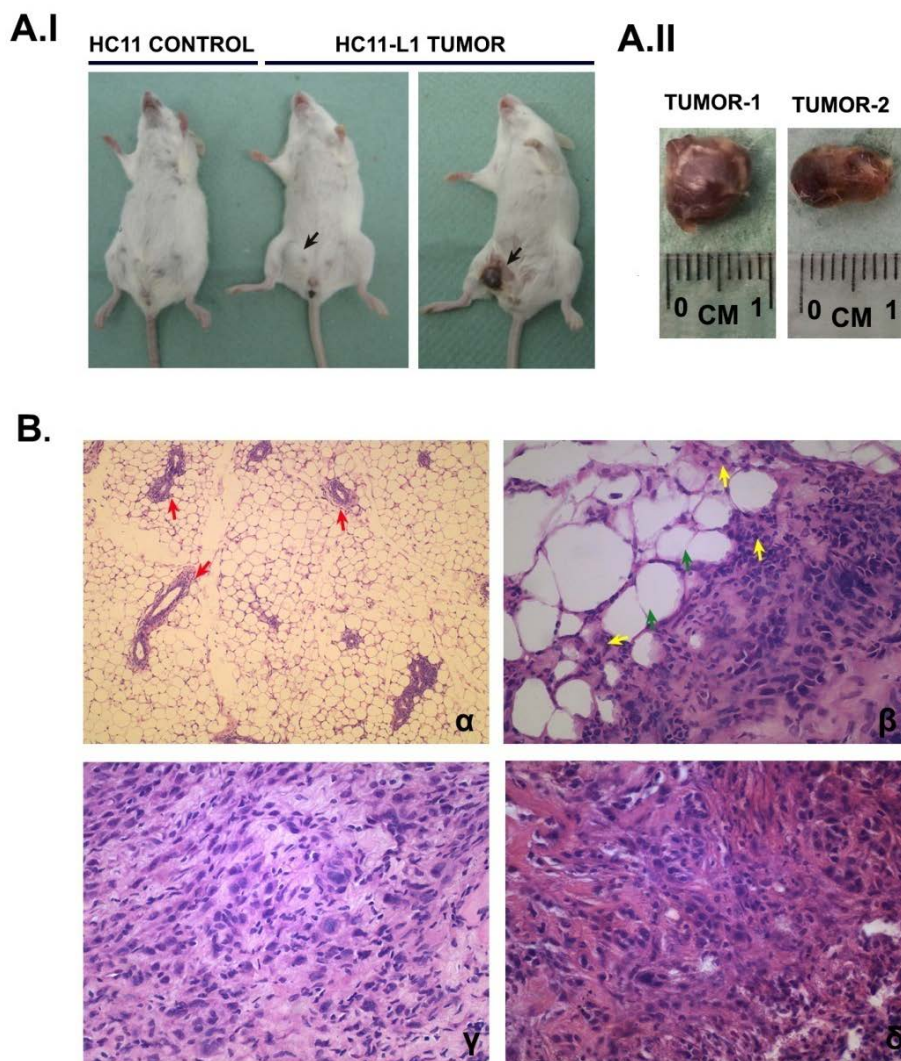
ανάπτυξη σε τέσσερα από τα επτά ποντίκια στην περίπτωση των κυττάρων HC11- L1, σε διάστημα 14 ημερών μετά την ένεση των κυττάρων στα ζώα, γεγονός που αποτελεί σημαντικό τεκμήριο για τη συμβολή των L1 στη καρκινογένεση. 2. Στην περίπτωση των ποντικών που ενέθηκαν με τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30, νεόπλασμα ανέπτυξε ένα ποντίκι από τα επτά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη νεοπλασμάτων παρατηρήθηκε 14-20 ημέρες μετά από την ημέρα εισαγωγής των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων στα ποντίκια. 3. Τα κύτταρα HC11-μάρτυρες, δεν έδωσαν όγκους, όπως αναμενόταν.

Τα κακοήγη νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται γενικά αφενός από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αφετέρου από διηθητική επέκταση τόσο σε γειτονικούς όσο και σε απομακρυσμένους ιστούς. Σε ένα επόμενο στάδιο, προκειμένου να αναλύσουμε περαιτέρω και να ταυτοποιήσουμε εάν τα παραγόμενα νεοπλάσματα εμφανίζουν χαρακτήρες κακοήθειας, πραγματοποιήθηκαν τομές παραφίνης των νεοπλασμάτων. Η ανάλυση τομών παραφίνης στην περίπτωση των κυττάρων HC11-VL30 απέκαλυψε στοιχεία κακοήθειας (Εικόνα 3.27). Συγκεκριμένα, το νεόπλασμα χαρακτηρίστηκε ως συμπαγές αδιαφοροποίητο νεόπλασμα με ένα διάχυτο κυρίως πρότυπο ανάπτυξης, χωρίς την παρουσία αδενικών σχηματισμών που να προσομοιάζουν το φυσιολογικό μαστικό παρέγχυμα (χαμηλής διαφοροποίησης). Τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονταν κατά ένα διάχυτο ή κατά θέσεις συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης, με σαφώς άτυπους, πλειόμορφους, συχνά υπερχρωματικούς πυρήνες, εμφανείς πυρηνίσκους και μέτρια μιτωτική δραστηριότητα. (Εικόνα 3.27 D). Προκειμένου να ερευνήσουμε πιθανή επιθηλιακή διαφοροποίηση ελέξαμε σε τομές παραφίνης την έκφραση της πρωτεΐνης πανκερατίνης με τη τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Ανοσοϊστοχημικά (Εικόνα 3.28) τα νεοπλασματικά κύτταρα χαρακτηρίστηκαν, κατά θέσεις, από θετικότητα για το αντίσωμα της πανκερατίνης υποδηλώνοντας εστιακή επιθηλιακή διαφοροποίηση. Παρατηρήθηκε έντονη κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων που σχηματίζουν συμπαγείς αθροίσεις και εστιακά παρέχεται η εντύπωση εκτροπικής μορφής αδενίου. Επιπρόσθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα είχαν την τάση να επεκτείνονται διηθητικά στα γύρω μαλακά μόρια, τον λιπώδη (Εικόνα 3.27 B.II) και μυϊκό ιστό (Εικόνα 3.27 C) αποδεικνύοντας τη διηθητική συμπεριφορά ενός κακοήθους όγκου.



Εικόνα 3.28: Ανοσistoχημική χρώση πανκρεατίνης σε τομές παραφίνης όγκου HC11-VL30. Παρουσία χαμηλής διαφοροποίησης κακοήθους νεοπλάσματος, κατά θέσεις αναγνωρίζονται συμπαγείς αθροίσεις κυττάρων (καφέ χρώση) με σχετικά άφθονο κυτταρόπλασμα και σαφείς χαρακτήρες ατυπίας. Καφέ χρώση (μαύρα βέλη): θετικότητα στην PanCytokeratin, εστιακή επιθηλιακή διαφοροποίηση νεοπλασματικών κυττάρων, εντύπωση εκτροπικής μορφής αδενίου. Μπλε πυρήνες: νεοπλασματικά κύτταρα

Επίσης, η ανάλυση των τομών νεοπλασμάτων απεκάλυψε στοιχεία κακοήθειας και στην περίπτωση των νεοπλασμάτων που προέκυψαν από την ένεση θετικών ρετρομετάθεσης μαζικών κλώνων HC11-L1 σε ποντίκια Balb/c (Εικόνα 3.29). Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση των κυττάρων HC11-VL30, τα παραγόμενα νεοπλάσματα χαρακτηρίστηκαν ως συμπαγή αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα χωρίς την παρουσία φυσιολογικών αδενικών σχηματισμών του μαστικού αδένου (χαμηλής διαφοροποίησης). Τα νεοπλασματικά κύτταρα χαρακτηρίζονταν από την ύπαρξη πολυμορφικών και υπερχρωματικών πυρήνων με ένα διάχυτο κυρίως πρότυπο ανάπτυξης ή κατά θέσεις συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης με την παρουσία συναθροίσεων κυττάρων (nests of tumor cells), αυξημένου αριθμού ινοβλαστών και ιών κολλαγόνου (Εικόνα 3.29 Β.β-δ). Τέλος τα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν ικανά να διηθούν τον λιπώδη ιστό (Εικόνα 3.29 Β.β), φανερώνοντας την ικανότητά τους για διήθηση και μετέπειτα μετάσταση σε άλλα μέρη του ζώου.

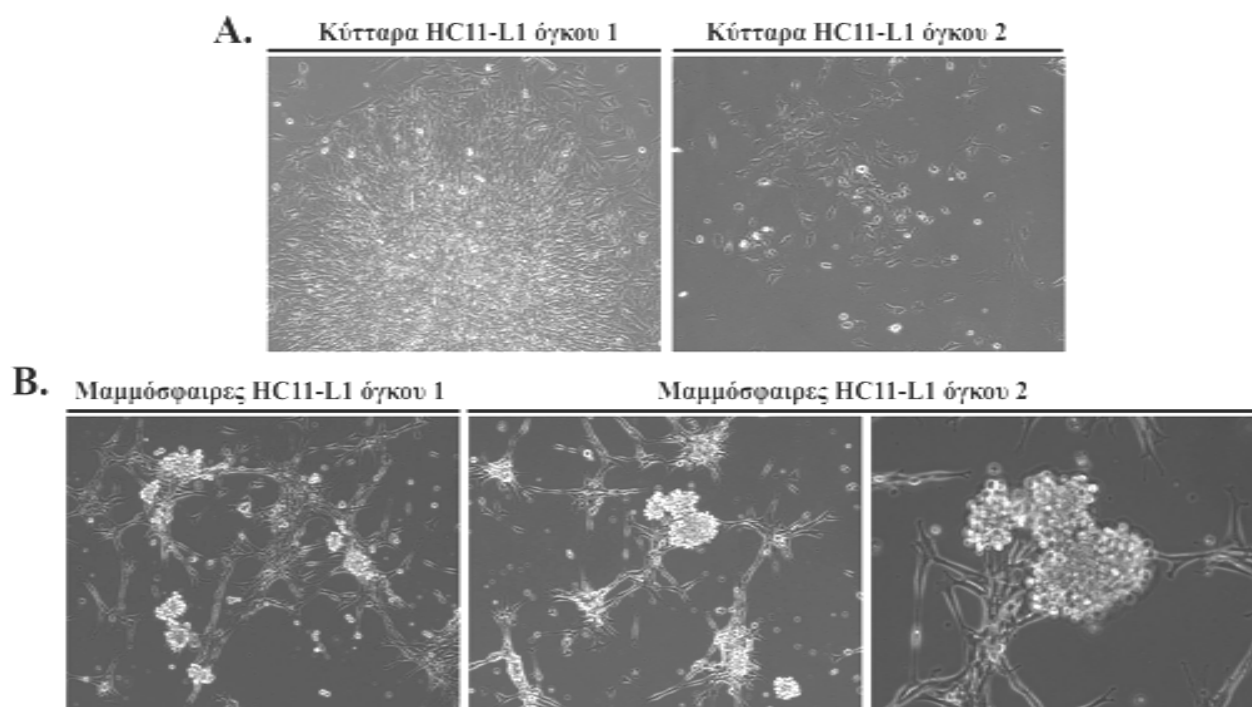


Εικόνα 3.29: Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα *HC11-L1* έχουν την ικανότητα πρόκλησης ογκογένεσης σε ποντίκια *Balb/c*. Πραγματοποιήθηκαν ενέσεις 5×10^6 κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης μαζικών κλώνων *HC11-L1* και κυττάρων-μαρτύρων *HC11* σε ποντίκια *Balb/c*. (A.I) Το μαύρο βέλος δείχνει τη θέση όπου έγιναν οι ενέσεις των κυττάρων και το αναπτυσσόμενο νεόπλασμα δίπλα στον μαστικό αδένα στην κοιλιακή χώρα του ζώου. (A.II) Απεικονίζονται ενδεικτικά δύο από τα τέσσερα παραχθέντα νεοπλάσματα, διαμέτρου 1 εκατοστού. (B.α) Τομή παραφίνης λιπώδους ιστού ζώου χωρίς ένεση κυττάρων (μεγένθυση 10X). Τα κόκκινα βέλη δηλώνουν τους φυσιολογικούς μαστικούς αδένες του ζώου. (B.β-δ) Τομές παραφίνης νεοπλάσματος. (β) Τα κύτταρα με σκουρόχρωμους μπλε πυρήνες αντιστοιχούν στα νεοπλασματικά/καρκινικά κύτταρα (κίτρινα βέλη), τα οποία διηθούν τον λιπώδη ιστό (πράσινα βέλη) (μεγένθυση 20X). (γ) Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ένα διάχυτο τύπο πρότυπο ανάπτυξης με πολυμορφικούς και υπερχρωματικούς πυρήνες (μεγένθυση 40X). (B.δ) Παρουσιάζεται η απουσία φυσιολογικών δομών του μαστικού αδένα (ductal structures), συναθροίσεις κυττάρων (nests of tumor cells), αυξημένος αριθμός ινοβλαστών και ινών κολλαγόνου (μεγένθυση 40X).

Συμπεραίνουμε ότι η ρετρομετάθεση των μεταθετών στοιχείων L1 & VL30 σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11 προσδίδει στα εν λόγω κύτταρα την ικανότητα να παράγουν όγκους στα συγγενικά ποντίκια Balb/c.

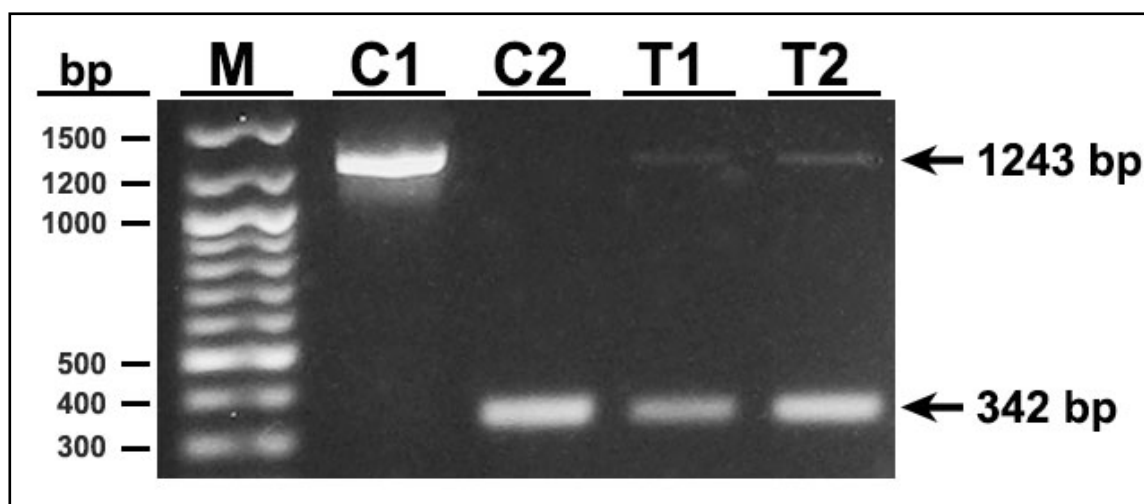
3.4.3 Απομονωμένα κύτταρα από όγκους HC11-L1NE ποντικών Balb/c, παράγουν μαμμόσφαιρες θετικές ρετρομετάθεσης

Προκειμένου να μελετήσουμε το είδος των κυττάρων που συνιστούν τους παραγόμενους όγκους, που προήλθαν από εισαγωγή θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων μαζικών κλώνων HC11-L1 σε συγγενικά ποντίκια Balb/c, απομονώσαμε κύτταρα από δύο όγκους με τη βοήθεια του ενζύμου κολλαγενάση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι τα απομονωμένα κύτταρα παρουσίασαν μεσεγχυματική μορφολογία, σχηματίζοντας συναθροίσεις κυττάρων σε καλλιέργεια (Εικόνα 3.30 Α).



Εικόνα 3.30: Τα απομονωμένα κύτταρα όγκων, που προήλθαν από εισαγωγή θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-L1NE σε συγγενικά ποντίκια Balb/c, παράγουν μαμμόσφαιρες. (Α) Τα απομονωμένα κύτταρα παρουσίασαν μεσεγχυματική μορφολογία και (Β) ικανότητα σχηματισμού μαμμοσφαιρών υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης.

Επιπλέον προκειμένου να διερευνήσουμε εάν τα κύτταρα αυτά διατηρούσαν την ικανότητά τους να παράγουν μαμμόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης, αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία. Αξιοσημείωτα, τα απομονωμένα κύτταρα σχημάτισαν μαμμόσφαιρες ακόμη και από την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας τους (Εικόνα 3.30 Β). Το γεγονός αυτό αποτελεί μια πολύ σημαντική παρατήρηση καθώς τα κύτταρα όγκων προερχόμενων από θετικούς ρετρομετάθεσης μαζικούς κλώνους HC11-L1 εμφανίζονται να διατηρούν την ικανότητα τους να παράγουν μαμμόσφαιρες, συντηρώντας ένα πληθυσμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων στον όγκο.



Εικόνα 3.31: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης των στοιχείων LINE σε απομονωμένα κύτταρα νεοπλασμάτων. Ποσότητες εκχυλίσματος DNA αναλύθηκαν με PCR και τα προϊόντα διαχωρίστηκαν σε πηκτή αгарόζης 1.2% (w/v). Στην περίπτωση των διαμολυσμένων με το VL30 κυττάρων HC11, ανιχνεύθηκαν αμφότερα τα προϊόντα των 1243 και η διαγνωστική για γεγονότα ρετρομετάθεσης ζώνη 342 bp σε απομονωμένα κύτταρα προερχόμενα από δύο νεοπλάσματα. M: μάρτυρας GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (B.II), C1: πλασμίδιο-μάρτυρας 99-RPS-EGFP/INT, ως προς την ζώνη των 1243 bp, που περιέχει το γονίδιο EGFP μαζί με το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης, C2: πλασμίδιο-μάρτυρας rEGFP-N1, ως προς τη ζώνη 342 bp, που περιέχει την EGFP χωρίς το ιντρόνιο γ-σφαιρίνης, T1, T2: DNA από κύτταρα νεοπλασμάτων προερχόμενων από ποντίκια Balb/c που ενέθηκαν με κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων HC11-L1.

Τέλος, προκειμένου να διερευνήσουμε μοριακά την θετικότητα ως προς την ρετρομετάθεση, των προερχόμενων από όγκους απομονωμένων νεοπλασματικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα (ενότητα 2.2.3). Πράγματι έπειτα από ανάλυση

PCR σε εκχυλίσματα DNA των νεοπλασματικών κυττάρων (T1, T2), επιβεβαιώθηκε ότι τα απομονωμένα κύτταρα είναι θετικά σε ρετρομετάθεση, με την παρουσία των δύο αναμενόμενων προϊόντων: α) της ζώνης 1243 bp που αντιστοιχεί στο μη ματισμένο στοιχείο LINE-1 του αρχικού διαμολυσμένου πλασμιδίου 99RPS/EGFP-INT και β) της διαγνωστικής, για γεγονότα ρετρομετάθεσης, ζώνης 342 bp, που αντιστοιχεί στο ματισμένο μεταγράφημα μετά από απομάκρυνση του ιντρονίου της γ-σφαιρίνης (Εικόνα 3.31).

3.5 Προσέγγιση του μηχανισμού δράσης των ρετροτρανσποζονίων

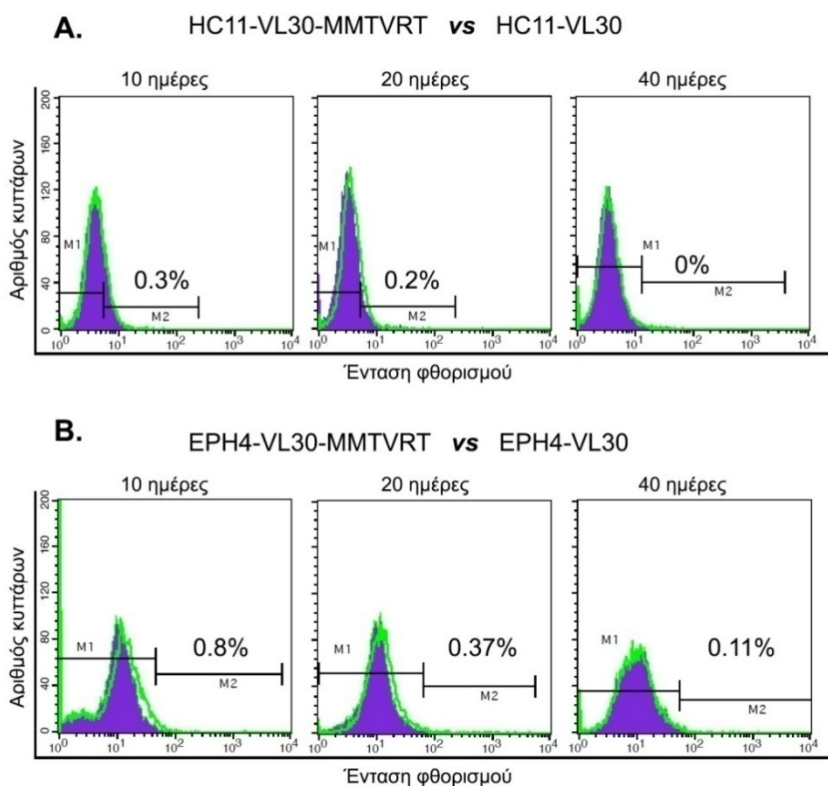
Δεδομένης της δυσκολίας ανεύρεσης του πιθανού μηχανισμού δράσης των ρετροτρανσποζονίων στην επαγωγή EMT, καρκινικών βλαστικών κυττάρων και καρκινογένεσης, επιχειρήσαμε να επιλύσουμε το ερώτημα αυτό μέσα από τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως περιγράφονται παρακάτω.

3.5.1 Η επίδραση του MMTV στην επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης VL30 & μείωσης του χρόνου επαγωγής EMT

Η πριν ~60 χρόνια παρατήρηση, ότι ο ογκογόνος ρετροϊός μαστού των τρωκτικών (MMTV) είναι ικανός να προκαλεί επαγωγική καρκινογένεση σε μαστό ποντικού, πρότεινε την ρετροϊική μοριακή βάση του αντίστοιχου ανθρώπινου καρκίνου μαστού και ο ποντικός αποτέλεσε ζωϊκό μοντέλο μελέτης του. Μέχρι σήμερα όμως δεν έχει ευρεθεί ένας ανθρώπινος εξωγενής, μολυσματικά ενεργός και συγγενικός του MMTV, ρετροϊός όπως πιστευόταν. Στην συνέχεια της μελέτης μας θελήσαμε να εξακριβώσουμε εάν ο ρετροϊός MMTV μπορεί να προκαλέσει επαγωγή της ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30, που θα μπορούσε να προτείνει ως βασική αιτιολογία καρκινογένεσης το καθαρά ενδοκυτταρικό φαινόμενο της ρετρομετάθεσης.

Για το σκοπό αυτό, για να προσομοιάσουμε ένα μοντέλο μελέτης της δράσης του ιού MMTV, κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pCDNA3.1-MMTVRT που περιέχει κλωνοποιημένο το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) του ιού MMTV. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση σε 2 κλώνους ανά περίπτωση κυττάρων HC11-VL30 και EPH4-VL30 και τα κύτταρα επιλέχθηκαν με πουρομυκίνη με το εν λόγω

πλασμίδιο. Σε απομονωμένους μαζικούς κλώνους, μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης των προς μελέτη κλώνων σε διάφορα χρονικά σημεία για ένα μήνα.



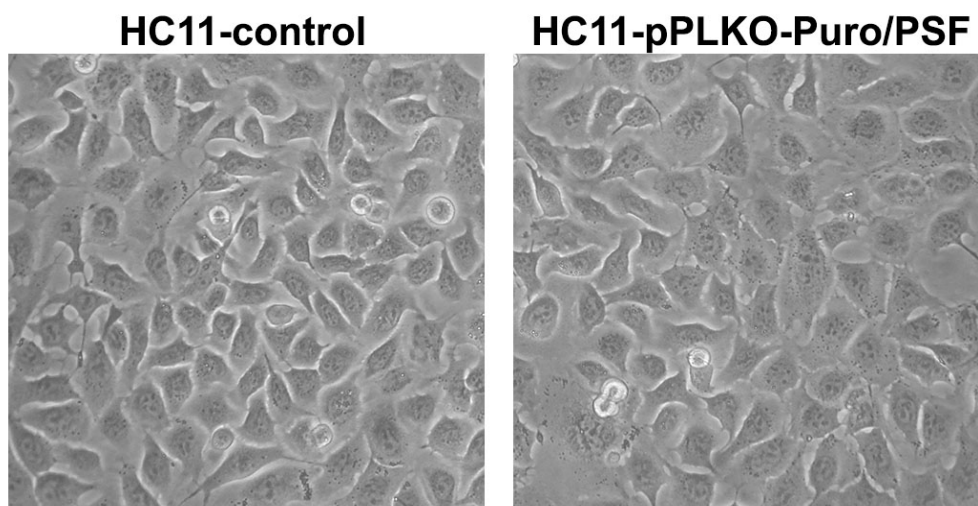
Εικόνα 3.32: Η αντίστροφη μεταγραφή (RT) του ιού MMTV δεν επάγει τη ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συχνότητας ρετρομετάθεσης των ρετροτρανσποζονίων VL30, μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο pCDNA3-MMTVRT, σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους HC11-VL30 & EPH4-VL30.

Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 3.32 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συχνότητας ρετρομετάθεσης των ρετροτρανσποζονίων VL30, μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο pCDNA3-MMTVRT, ενδεικτικά σε θετικούς ρετρομετάθεσης μαζικούς κλώνους HC11-VL30 (Εικόνα 3.31 A) και EPH4-VL30 (Εικόνα 3.32 B). Έπειτα από μέτρηση της συχνότητα ρετρομετάθεσης στις 10, 20 και 30 ημέρες μετά από την διαμόλυνση των εν λόγω θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων με το πλασμίδιο pCDNA3-MMTVRT, δεν σημειώθηκε ιδιαίτερη αύξηση της ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30. Τα ποσοστά αύξησης της ρετρομετάθεσης κυμάνθηκαν μεταξύ 0-0.8%. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η αντίστροφη μεταγραφή του ιού MMTV δεν επάγει σημαντικά τη ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30.

3.5.2 Η εμπλοκή της ογκοπρωτεΐνης PSF στο μηχανισμό της VL30-επαγόμενης EMT και παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων

Είναι γνωστό ότι ο παράγοντας PSF ή Splicing Factor proline / glutamine rich (polyurimidine tract binding protein), που αναφέρεται και ως SFPQ, αποτελεί ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη και αποτρέπει την έκφραση ογκογονιδίων. Επίσης το mRNA του ρετροτρανσποζονίου VL30 έχει την ιδιότητα να δεσμεύει τον παράγοντα PSF, γεγονός που επάγει στεροειδογένεση αλλά και αναστρέψιμη έκφραση κατεσταλμένων ογκογονιδίων αυξάνοντας το μεταστατικό δυναμικό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Στην λογική αυτή στόχος του επόμενου βήματός μας ήταν να εξετάσουμε μια πιθανή προσέγγιση στην κατανόηση του μηχανισμού της VL30-επαγόμενης EMT και παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσω μειορρυθμισμένης έκφρασης της πρωτεΐνης PSF, με τεχνολογία shRNA, σε κανονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού. Οι πειραματικές προσεγγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια. Χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pLKO.1-Puro (empty vector) ως μάρτυρας και pLKO-Puro/PSF που φέρει: την αλληλουχία βάσεων **CCGG-CCAGGAAGAATTAAGGCGCAT-CTCGAG-ATGCGCCTTAATTCTTCCTGG-TTTTGG**, ικανή μειορύθμισης της έκφρασης RNA του γονιδίου PSF, όπως και τη μεταγραφική μονάδα του γονιδίου της πουρομυκίνης ως δείκτη επιλογής κυτταρικών κλώνων.

Για να διερευνήσουμε την ανωτέρω υπόθεση, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κανονικών κυττάρων HC11 είτε με 2.5μg του πλασμιδίου pLKO.1-Puro ή του αντίστοιχου pLKO-Puro/PSF. Μετά από 48 ώρες οι διαμολυσμένες καλλιέργειες επιλέχθηκαν με 1-9 μg πουρομυκίνης/ml θρεπτικού υλικού για 7-10 ημέρες και απομονώθηκαν μαζικοί κλώνοι από κάθε περίπτωση. Στη συνέχεια, κύτταρα απομονωμένων κλώνων καλλιεργήθηκαν για διάστημα ενός μηνός και πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε καθημερινή βάση των κυτταροκαλλιεργειών με μικροσκοπική παρατήρηση για φαινόμενα πιθανής φαινοτυπικής αλλαγής EMT. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.33, η μειορύθμιση της πρωτεΐνης PSF, δεν εμπλέκεται στην μετάπτωση EMT, καθώς τα κύτταρα HC11 με μειορύθμισμένη RNA έκφραση του γονιδίου PSF δεν παρουσίασαν φαινοτυπικές αλλαγές συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες HC11.



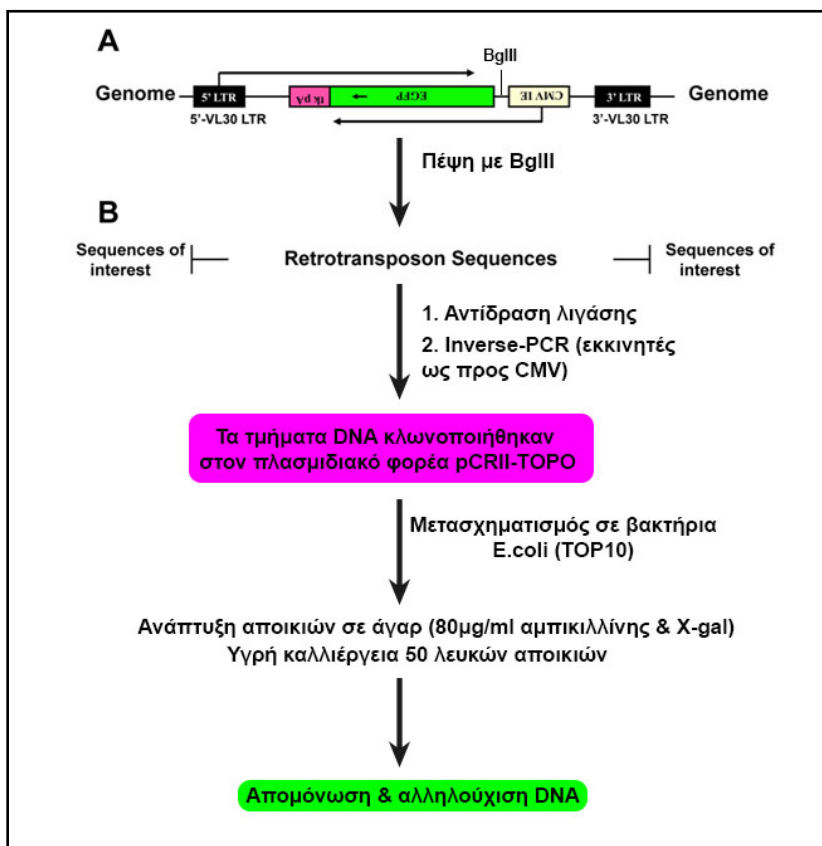
Εικόνα 3.33: Η μειорύθμιση της έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PSF δεν εμπλέκεται στην επαγωγή EMT σε κύτταρα HC11. Μη διαμολυσμένα κύτταρα HC11 ως μάρτυρας (HC11-control) και μαζικοί κλώνοι κυττάρων διαμολυσμένων με pLKO-Puro/PSF και επιλεγμένων με πουρομυκίνη καλλιιεργήθηκαν και φωτογραφήθηκαν μετά από 30 ημέρες.

Συμπεραίνουμε, ότι η μειорύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης PSF δεν συμμετέχει στον πιθανό μηχανισμό της VL30-επαγόμενης EMT και παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων

3.5.3 Ανεύρεση ενσωματώσεων του ρετροτρανσποζονίου VL30 με τη τεχνική inverse PCR σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους

Είναι γνωστό, ότι τα ρετρομεταθετά στοιχεία δύναται κατά την μετάθεση τους να ενσωματωθούν σε γενωμικές θέσεις με επακόλουθο να επηρεάσουν την έκφραση διάφορων γονιδίων ή να οδηγήσουν στην αποσιώπηση τους ή να επάξουν την έκφραση τους. Τα αποτελέσματά μας, στην παρούσα μελέτη συνηγορούν με τα παραπάνω, όπως φάνηκε έπειτα από την αποσιώπηση του γονιδίου της E-καντερίνης και της υπερέκφρασης γονιδίων όπως N-καντερίνης, Φιμπρονεκτίνης, Βιμεντίνης, καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων Slug, Snail, Twist και της κυτοκίνης TGF- β . Τα εν λόγω αυτά γονίδια συμμετέχουν στο δίκτυο επαγωγής της μετάπτωσης EMT στα επιθηλιακά κύτταρα μαστού, όπως έχει αποδειχθεί και βιβλιογραφικά αλλά και στην παρούσα

μελέτη. Επίσης, αποδείξαμε και την επαγωγή δεικτών καρκινικών κυττάρων όπως το CD44 και το Oct4 αλλά και μείωσης της έκφρασης του γονιδίου CD24.



Εικόνα 3.34: Γραφική αναπαράσταση ανεύρεσης νέων ενσωματώσεων του ρετροτρανσποζονίου VL30 στο γένωμα. A. Μια νέα ενσωμάτωση του ανασυνδιασμένου ρετροτρανσποζονίου πλαισιώνεται από γενομικό DNA. Το ανασυνδιασμένο στοιχείο φέρει μια μοναδική περιοριστική θέση για το ένζυμο BglIII. **B.** Η πέψη ολικού γενομικού DNA με το ένζυμο BglIII και η μετέπειτα πραγματοποίηση inverse PCR και αλληλούχιση των απομονωμένων τμημάτων DNA ενδέχεται να αποκαλύψει στα άκρα τους αλληλουχίες σχετικά με EMT.

Συνολικά τα δεδομένα μας αυτά, μας οδήγησαν να διερευνήσουμε και να βρούμε πιθανές θέσεις ενσωμάτωσης του ρετροτρανσποζονίου VL30 στο γένωμα. Υπόθεσή μας ήταν ότι οι νέες ενσωματώσεις του ανασυνδιασμένου ρετροτρανσποζονίου VL30 θα εντοπιζόντουσαν σε θέσεις κοντά στα γονίδια που προαναφέρθηκαν, επηρεάζοντας της έκφρασή τους. Για να προσεγγίσουμε την υπόθεση αυτή απομονώσαμε DNA από μαζικούς κλώνους HC11-VL30, αλλά και από τον κλώνο με την μεγαλύτερη συχνότητα

ρετρομετάθεσης HC11-VL30 c1.19. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη του γενωμικού DNA των κλώνων με το ένζυμο BglIII, το οποίο πέπτει το DNA κοντά στον υποκινητή του CMV που βρίσκεται στην αρχική ανασυνδιασμένη κατασκευή VL30, όπως επίσης και σε γενωμικές θέσεις πέραν του ανασυνδιασμένου στοιχείου VL30, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.34. Στην συνέχεια, στο κατακερματισμένο πλέον DNA πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης και ακολούθως αντίδραση inverse-PCR στα κυκλοποιημένα τμήματα DNA με ειδικά σχεδιασμένους στον CMV εκκινητές. Στην πορεία με τη χρήση ειδικών αντιδραστηρίων (TOPO TA Cloning Kit, Dual Promoter, with pCRII-TOPO Vector) τα τμήματα DNA κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Αφού πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli (TOP10) και ανάπτυξη αποικιών σε στερεό θρεπτικό μέσο (άγαρ) περιέχον 80μg/ml αμικικιλίνης και X-gal, απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια 50 λευκές αποικίες ανά περίπτωση κλώνων (μαζικών κλώνων και κλώνου HC11-VL30 c1.19). Ακολούθως, απομονώθηκε DNA από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, και τέλος πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση στα δείγματα DNA.

Η ανάλυση των αλληλουχιών δεν πιστοποίησε κλωνοποίηση τμημάτων CMV/γενωμικού DNA.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κύριο ερώτημα της παρούσας έρευνας ήταν εάν η ρετρομετάθεση συσχετίζεται με την επαγωγή EMT και καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού. Γνωρίζοντας την μεταλλαξιγόνα δράση των ρετροτρανσποζονίων εξετάσαμε τις επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης, χρησιμοποιώντας ως κυτταρικό μοντέλο επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού, με δύο προσεγγίσεις: **α.** μέσω διαμόλυνσης του ανασυνδιασμένου ρετροτρανσποζονίου VL30 σε προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού HC11 αλλά και στις διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές μαστού ποντικού EPH4 (J3B1A) και C127 και **β.** μέσω διαμόλυνσης μόνο προγονικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού HC11 με τρία διαφορετικά ανασυνδυασμένα ρετροτρανσποζόνια VL30, L1 και DO.MT. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί η ειδικότητα των γεγονότων ρετρομετάθεσης VL30, L1 και DO.MT που ανιχνεύθηκαν η οποία υποστηρίζεται από τρεις πειραματικές μαρτυρίες: **1.** Οι ανασυνδιασμένες ρετροτρανσποζονιακές κατασκευές pNVL-3*/EGFP-INT (VL30), 99-RPS-EGFP/INT (L1) και του ρετροϊού MoMLV (ως ρετροτρανσποζόνιο), pDO.MT/gpt-EGFP-INT (DO.MT) σχεδιάστηκαν έτσι ώστε η πρωτεΐνη EGFP να εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο εφόσον πραγματοποιηθεί ένα επιτυχές γεγονός ρετρομετάθεσης (104, 111). **2.** Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα στοιχειοθετήθηκαν ως πράσινα κύτταρα με μικροσκοπία φθορισμού και με ανάλυση FACS μετρώντας τη συχνότητα ρετρομεταθέσεων (Εικόνα 2) και **3.** οι ρετρομεταθέσεις επιβεβαιώθηκαν ως γενωμικές ρετροτρανσποζονιακές ενσωματώσεις με την ανίχνευση της ζώνης των 342bp που είναι διαγνωστική των γεγονότων ρετρομετάθεσης (Εικόνα 3).

Όσον αφορά την πρώτη προσέγγιση μας στη μελέτη των επιπτώσεων της ρετρομετάθεσης του μη αυτόνομου ανασυνδυασμένου ρετρομεταθετού στοιχείου VL30 στις κυτταρικές σειρές μαστού ποντικού HC11, EPH4 (J3B1A) και C127 διαπιστώσαμε παραγωγή ρετρομεταθέσεων χωρίς την αναγκαιότητα επίδρασης στα κύτταρα με κάποιο ερέθισμα, γεγονός που δεν αναμενόταν. Η σπουδαιότητα της παρατήρησης αυτής καθίσταται φανερή από αποτελέσματα προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου μας, όπου παραγωγή ρετρομεταθέσεων του στοιχείου VL30 παρατηρήθηκε μόνο έπειτα από

την επίδραση με παράγοντες όπως το βαρύ μέταλλο βανάδιο (104) ή αρσενικό (105) ή H_2O_2 (106) σε κύτταρα ινοβλαστών NIH3T3 ή σε μετασηματισμένα από τον ρετροϊό SV40 κύτταρα NIH3T3 (104). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι τόσο τα προγονικά κύτταρα μαστού HC11 όσο και τα ανάλογα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα μαστού ποντικού C127 και EPH4 παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης VL30, συγκριτικά με τα κύτταρα ινοβλαστών, ανεξάρτητα από το στάδιο διαφοροποίησής τους. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι τα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού παρέχουν ένα ευνοϊκότερο και πιο δεκτικό περιβάλλον παραγωγής ρετρομεταθέσεων συγκριτικά με τα μη-προγονικά κύτταρα C127 και EPH4. Αυτό υποστηρίζεται από το ότι τα ποσοστά ρετρομετάθεσης τόσο μαζικών όσο και μονήρων κλώνων HC11-VL30 ήταν υψηλότερα συγκριτικά με τους μαζικούς και μονήρεις κλώνους EPH4-VL30 και C127-VL30 (Πίνακας 3.1 και Εικόνα 1). Επιπρόσθετα, το ευνοϊκό περιβάλλον παραγωγής ρετρομεταθέσεων σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11 τεκμηριώθηκε περαιτέρω, έπειτα από διαμόλυνσή των τόσο με το ανθρώπινο ρετροτρασποζόνιο L1 όσο και εκείνο του ρετροϊού MoMLV (DO.MT), όπου ευρέθησαν επίσης γεγονότα ρετρομετάθεσης (Πίνακας 3.1 και Εικόνα 1).

Ένα κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η επαγωγή EMT στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, γεγονός που υποστηρίζεται από τα ακόλουθα ευρήματά μας: **(α)** σε κυτταρικό επίπεδο, τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 απέκτησαν ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο με την εμφάνιση φιλοποδίων και συσχετιζόμενων κυτταροσκελετικών αλλαγών, φαινόμενα που παρατηρούνται έπειτα από επαγωγή EMT (191) (Εικόνα 4 & Εικόνα 6), **(β)** σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η έκφραση της E-καντερίνης αποσιωποιήθηκε εντελώς με επακόλουθη έκφραση των πρωτεϊνών N-καντερίνης, φμπρονεκτίνης και βιμεντίνης, όπως τεκμηριώθηκε με ανοσοφθορισμό (Εικόνα 7) και western blotting (Εικόνα 9), **(γ)** σε επίπεδο RNA, παρατηρήθηκε αυξημένη μεταγραφική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Slug, Snail και της κυτοκίνης TGF- β 1 με ιδιαίτερα ισχυρή επαγωγή έκφρασης του παράγοντα Twist στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους HC11-VL30 (Εικόνα 10). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ρετρομετάθεση VL30 προκαλεί επαγωγή EMT, αφού είναι γνωστό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες Slug, Snail, Twist, καθώς και η κυτοκίνη TGF- β μεταγωγής σήματος (signal transducer)

συσχετίζονται με EMT (226). Παρομοίως, κύτταρα μαζικών κλώνων HC11-L1 παρουσίασαν επίσης αυξημένη έκφραση mRNA των γονιδίων Slug, Snail και Twist, ενώ δε σημειώθηκε ιδιαίτερη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου TGF-β1 συγκριτικά με τον μάρτυρα HC11 (Εικόνα 11). Τα αποτελέσματα αυτά στοιχειοθετούν μια διαφορική επίπτωση της ρετρομετάθεσης των L1, σε σχέση με των VL30, στην επαγωγίμη EMT χωρίς την αυξημένη έκφραση της TGF-β. **(δ)** Τέλος, η ρετρομετάθεση VL30 και L1, ως ερέθισμα μπορεί να αυξήσει το μεταστατικό δυναμικό των ρετρομεταθετικά-θετικών κυττάρων HC11, όπως αποδείχθηκε με τη τεχνολογία RTCA-DP-Xcelligence (Εικόνα 12) και με ανάπτυξη κυττάρων σε γέλη matrigel (Εικόνα 14). Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν ισχυρά την σύνδεση μεταξύ της ρετρομετάθεσης των ρετροτρανσποζονίων VL30 και L1 με την επαγωγή EMT σε προγονικά κύτταρα μαστού HC11 μέσω μιας συντονισμένης επαγωγής έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην EMT, όπως το μονοπάτι TGF-β και οι μεταγραφικοί παράγοντες Snail, Slug, Twist, που αποτελούν κρίσιμους δείκτες για την επαγωγή EMT (183, 268).

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν τη σύνδεση της επαγωγής EMT με την απόκτηση ιδιοτήτων βλαστικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα μαστού (234, 269). Συγκεκριμένα, η επαγωγή έκφρασης των παραγόντων Slug, Snail, Twist και TGF-β είναι γνωστό ότι προωθεί την επαγωγή EMT αλλά και συνδέεται: **α.** με τον αντιγονικό φαινότυπο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μαστού CD24^{low}/CD44⁺ (234) και **β.** με σηματοδοτικά μονοπάτια επαγωγής και διατήρησης των βλαστικών κυττάρων (270). Η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικά πειραματικά τεκμήρια που υποστηρίζουν και τις δύο αυτές προτάσεις αποκαλύπτοντας ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης συνδέεται με την επαγωγή EMT και καρκίνου.

Όσον αφορά την σύνδεση μεταξύ EMT και καρκινικών βλαστικών κυττάρων έχουμε στοιχειοθετήσει ότι τα θετικά-ρετρομετάθεσης και EMT-κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1: **(α)** απέκτησαν την ικανότητα να αναπτύσσονται υπό συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης ορού (Εικόνα 15) και **(β)** ήταν ικανά να παράγουν μαμμόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης (Εικόνα 16). **(γ)** Τα κύτταρα μαμμοσφαιρών HC11-VL30 και HC11-L1 είχαν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται (Εικόνα 17) και χαρακτηρίστηκαν θετικά ως προς την έκφραση του αντιγονικού φαινοτύπου των

καρκινικών βλαστικών κυττάρων CD24^{-low}/CD44⁺ (Εικόνα 19) αλλά και του παράγοντα βλαστικότητας Oct4 (271) (Εικόνα 18). Επιπλέον, τα κύτταρα μαμμοσφαιρών HC11-L1 παρουσίασαν έκφραση και του παράγοντα Nanog (Εικόνα 18), ενός απαραίτητου μεταγραφικού παράγοντα-κλειδί για την διατήρηση πολυδυναμίας (pluripotency) των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, ο οποίος δεν εκφράζεται στους περισσότερους φυσιολογικούς ενήλικες ιστούς. Εντούτοις, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη Nanog προωθεί το μεταναστευτικό και διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων μαστού (272). **(δ)** Επιπλέον, στην περίπτωση του ρετροτρανσποζονίου VL30 (κύτταρα HC11-VL30), τα κύτταρα μαμμοσφαιρών ήταν ικανά να διαφοροποιούνται, οδηγώντας στο σχηματισμό δομών μαστικού αδένου (acini-like mammary gland structures) (273), αποτελούμενων από τουλάχιστον 2 διακριτά κυτταρικά στρώματα που ενδεχομένως να αντιστοιχούν σε μυοεπιθηλιακά κύτταρα (εξωτερικό στρώμα) και σε κύτταρα του αυλού (εσωτερικά επιθηλιακά κύτταρα της δομής), (Εικόνες 20, 21 και 22). Όσον αφορά τα κύτταρα HC11-L1, αυτά σχημάτιζαν δομές κυττάρων αποτελούμενες μορφολογικά κυρίως από μεσεγχυματικά κύτταρα και σε μικρότερο ποσοστό από επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνες 24 και 25). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν και η παρουσία κυττάρων ενός ενδιάμεσου επιθηλιακού/μεσεγχυματικού φαινότυπου που πιστοποιείται από κυλινδρική επιθηλιακή μορφολογία αλλά επίσης και από χαρακτηριστικά φιλοπόδια των μεσεγχυματικών κυττάρων (Εικόνες 21, 24, 25). Η παρατήρηση αυτή, αποτελεί μια ένδειξη ότι τα κύτταρα μαμμοσφαιρών κατά το μονοπάτι διαφοροποίησής τους μεταπίπτουν ανάμεσα στην EMT αλλά και την αντίστροφη μεσεγχυματική- επιθηλιακή μετάπτωση MET (274).

Γνωρίζοντας ότι τα κύτταρα HC11 έχουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι η ρετρομετάθεση συμβάλλει στην επαγωγική διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών. Οι διαφορές ανάμεσα στις κυτταρικές δομές που σχηματίζονται στις δύο περιπτώσεις των ρετροτρανσποζονίων VL30 και L1, ενδεχομένως να οφείλονται στο διαφορετικό δυναμικό διαφοροποίησης της ρετρομετάθεσης του κάθε ρετροτρανσποζονίου, οδηγώντας σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ανά περίπτωση, όπως φαίνονται στις Εικόνες 21-24. Βάσει των παρατηρήσεων αυτών, προτείνουμε ότι η διαφορετική επαγωγή της ρετρομετάθεσης της ισορροπίας των ενδογενών ρετροτρανσποζονίων επηρεάζει τη μοίρα των

βλαστικών/προγονικών κυττάρων HC11, οδηγώντας τα κύτταρα σε διαφορετικούς κυτταρικούς φαινότυπους.

Ολοένα και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο καρκίνος μαστού καθώς και άλλοι τύποι καρκίνων προκύπτουν από μια μικρή μερίδα βλαστικών/προγονικών κυττάρων με ιδιότητες αυτοανανέωσης. Κύρια παρατήρηση της παρούσας εργασίας ήταν η επαγωγή της μετάπτωσης EMT και καρκινικών βλαστικών κυττάρων μόνο στα προγονικά κύτταρα μαστού HC11, έπειτα από τη διαμόλυνση με το μη αυτόνομο ρετροτρανσποζόνιο VL30. Αντιθέτως, οι διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές μαστού EPH4 και C127, παρά την παραγωγή ρετρομεταθέσεων VL30 δεν παρουσίασαν καμία μορφολογική αλλαγή, διατηρώντας την αρχική κλασσική επιθηλιακή μορφολογία τους (Εικόνα 4). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στα προγονικά κύτταρα μαστού HC11 και στα διαφοροποιημένα κύτταρα EPH4 ή C127, όπου η ρετρομετάθεση του στοιχείου VL30 δύναται να οδηγήσει σε επαγωγή EMT μόνο τα βλαστικά/προγονικά κύτταρα μαστού HC11.

Μια βασική διαφορά ανάμεσα σε ένα βλαστικό/προγονικό κύτταρο και σε ένα διαφοροποιημένο είναι στη δομή του DNA. Σε ένα βλαστικό κύτταρο, υφίσταται μια πιο χαλαρή διαμόρφωση της χρωματίνης και τα γονίδια είναι ευκολότερα ενεργοποιήσιμα. Έπειτα από ανάλυση του συνολικού γενώματος πολυδύναμων (pluripotent cells) και διαφοροποιημένων κυττάρων, έχει προταθεί η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin remodeling) κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, η οποία οδηγεί σε μια σταδιακή μετάβαση από μια αρκετά ανοικτή χρωματίνη σε μια περισσότερο συμπυκνωμένη μορφή (275). Με την επίδραση κατάλληλων σημάτων εκκινεί η κυτταρική διαφοροποίηση, τα γονίδια που δεν είναι απαραίτητα αποσιωπούνται ενώ τα γονίδια που απαιτούνται για τις απαραίτητες ειδικές λειτουργίες παραμένουν ενεργά. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η επαγωγή της EMT καθοδηγείται από επιγενετικές τροποποιήσεις, με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (276). Οι πληροφορίες αυτές, μπορούν να αποτελούν μια βασική εξήγηση στην αλλαγή της επιθηλιακής μορφολογίας μόνο στα προγονικά κύτταρα HC11 και όχι στα διαφοροποιημένα κύτταρα C127 και EPH4, έπειτα από διαμόλυνση με το ρετροτρανσποζόνιο VL30. Το γεγονός αυτό υπονοεί ταυτόχρονα τη πιθανή συμβολή του φαινομένου της ρετρομετάθεσης στην επιγενετική τροποποίηση μεταξύ ετεροχρωματίνης

και ευχρωματινης κατά τη διαφοροποίηση από επιθηλιακά προγονικά προς μεσεγχυματικά κύτταρα, μέσω της EMT. Ένα επιπλέον στοιχείο που υποστηρίζει αυτή την υπόθεση είναι το γεγονός ότι πέραν του ρετροτρανσποζονίου VL30, η διαμόλυνση των προγονικών κυττάρων μαστού HC11 με το ενεργό ανθρώπινο ρετροτρανσποζόνιο LINE-1 (L1) οδήγησε, επίσης στην επαγωγή EMT.

Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, διάφορες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφορετικών προφίλ μεθυλίωσης ανάμεσα σε βλαστικά/προγονικά και τελικώς διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα μαστού (μυοεπιθηλιακά, κύτταρα αυλού μαστικού αδένου) (277). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη επιγενετικής ρύθμισης στην αποσιώπηση γονιδίων, ως βασικό βήμα στην πορεία επιθηλιακής διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων μαστού. Ακόμη, οι αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης ενδέχεται να προηγούνται του μορφολογικού μετασχηματισμού του φυσιολογικού επιθηλίου του μαστού, που αποτελεί ένα αρχικό στάδιο στην ογκογένεση (277). Βασιζόμενοι στα δεδομένα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε την εμπλοκή της ρετρομετάθεσης στην αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης και συμπύκνωσης της χρωματίνης, που έχει ως αποτέλεσμα αφενός μεν την ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων που οδηγούν στην επαγωγή EMT και παραγωγή καρκινικών κυττάρων, αλλά και αφετέρου στην περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων HC11 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του μαστικού αδένου.

Όπως έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, κατά τη ρετρομετάθεση, ένα αντίγραφο μεταθετού στοιχείου μπορεί να εισαχθεί σε γονίδια ή ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων διακόπτοντας τη φυσιολογική γονιδιακή λειτουργία και παράγοντας μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις (12, 36, 37, 120, 121). Ακόμη, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν υποδείξει ότι τόσο τα LTR ρετροτρανσποζόνια όσο και τα στοιχεία LINE εξυπηρετούν στην γονιδιακή έκφραση ως δότες υποκινητών, ενισχυτών και καταστολέων (135), καθιστώντας φανερή ταυτόχρονα και την επίδραση που μπορούν να έχουν νέες ενσωμάτωσεις τέτοιων στοιχείων στην έκφραση γονιδίων. Στην περίπτωση των ρετροτρανσποζονίων VL30, έχει βρεθεί ότι η περιοχή U3 των LTR φέρει μεταγραφικά ρυθμιστικά στοιχεία με ενεργότητες υποκινητών, ενισχυτών και καταστολέων (116). Το γεγονός αυτό αποτελεί τεκμήριο ότι ο υψηλός αριθμός αντιγράφων U3 σε πολλαπλές γενωμικές θέσεις μπορεί να έχει επιπτώσεις στην έκφραση πρωτεϊνών γειτονικών αλλά και απομακρυσμένων γονιδίων, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (116).

Παράλληλα, τα ανθρώπινα ρετροτρανσποζόνια L1 φέρουν δύο ρυθμιστικές μεταγραφικές περιοχές που εντοπίζονται στην 5'-αμετάφραστη περιοχή, 5'UTR (Εικόνα 3) : (α) ένα πρόσθιο (sense) εσωτερικό υποκινητή πολυμεράσης II, που οδηγεί την μεταγραφή του πλήρους μεγέθους L1, και (β) ένα ανάστροφο υποκινητή (antisense promoter, ASP), ο οποίος οδηγεί την μεταγραφή προς την αντίστροφη κατεύθυνση παρακείμενων περιοχών του L1 (17, 18).

Αξιοσημείωτα, γνωρίζουμε ότι η φυσική συχνότητα ρετρομετάθεσης σε φυσιολογικά κύτταρα είναι πολύ χαμηλή, της τάξεως του 10^{-6} γεγονότα ανά κύτταρο ανά κυτταρική γενεά, όπως έχει υπολογιστεί για ένα ελλειματικό σε γονίδιο pol ρετροϊό/ρετρομεταθετό στοιχείο (278) όπως είναι τα στοιχεία VL30. Τα πειραματικά δεδομένα μας απέδειξαν μια διακύμανση στο ποσοστό ρετρομετάθεσης στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους που κυμάνθηκε από 0.3 - 21.2% για τα κύτταρα HC11-VL30 που αντιστοιχεί σε 30,000 - 210,000 φορές αύξηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης και 0.3-50% για τα κύτταρα HC11-L1, ποσοστά που αντιστοιχούν σε αύξηση της τάξεως των 30,000 - 500,000 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά ποσοστά ρετρομετάθεσης. Δεδομένου των τυχαίων ενσωματώσεων των αντιγράφων VL30 και L1, οι νέες γενωμικές ενσωματώσεις μπορεί να εξηγήσουν την αποσιώπηση ή ενεργοποίηση γονιδίων στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1, όπως στοιχειοθετήθηκε από: (α) την αποσιώπηση του γονιδίου της E-καντερίνης και υπερέκφρασης των γονιδίων όπως N-καντερίνης, Φιμπρονεκτίνης, Βιμεντίνης (Εικόνα 9), καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων Slug, Snail, Twist και της κυτοκίνης TGF- β (Εικόνα 10 και 11) και (β) την επαγωγή έκφρασης δεικτών καρκινικών κυττάρων όπως CD44 και Oct4 αλλά και μείωσης της έκφρασης του γονιδίου CD24 (Εικόνα 19). Επομένως, σχετικά με τον παρατηρούμενο μηχανισμό επαγωγής EMT, μπορεί να προταθεί: α) ο υψηλός αριθμός ρετρομεταθέσεων συνδέεται με τη μεταλλαξιγόνο δράση της ρετρομετάθεσης και οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων υποστηρίζοντας ότι η μετάπτωση EMT προϋποθέτει, εκτός από παράγοντες με δυναμικό ώθησης προς EMT, και ένα απαιτούμενο αριθμό γονιδιακών μεταλλάξεων (183, 279). β) Τα αποτελέσματα αυτά, υπονοούν ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης δεν οδηγεί σε τυχαίες επιπτώσεις σε ένα κύτταρο αλλά συσχετίζεται με την επαγωγή της EMT και την παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Παράλληλα, προτείνουν ότι η

ρετρομετάθεση των νέων αντιγράφων VL30 και LI οδηγεί στην επαγωγή ενός συντονισμένου δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών που τελικά οδηγούν στον μετασχηματισμό του προγονικού επιθηλιακού κυττάρου μαστού προς καρκινικό. Εντούτοις, επιπρόσθετα πειράματα και μια πιο λεπτομερής ανάλυση είναι απαραίτητη για την διαλεύκανση αυτών των πιθανοτήτων.

Η μεγάλη σημασία των αποτελεσμάτων μας έγκειται στο ότι υποστηρίζουν την συμμετοχή της ρετρομετάθεσης των ρετροτρανσποζονίων VL30 και LINE-1 στην ογκογένεση καθώς τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα μαζικών κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 ήταν ικανά να παράγουν όγκους σε μη ανοσοκατασταλμένα συγγενικά ποντίκια Balb/c. Το ογκογενετικό δυναμικό των κυττάρων αυτών αναμένετο, βάσει των ιδιοτήτων τους που παρουσίασαν *in vitro* αντιπροσωπευτικοί κλώνοι HC11-VL30 και HC11-L1 με την απόκτηση χαρακτηριστικών EMT και καρκινικών βλαστικών κυττάρων, γεγονότα που αποτελούν προϋποθέσεις για την ανάπτυξη όγκων. Συγκεκριμένα έχουμε αποδείξει ότι: **α.** οι θετικοί ρετρομετάθεσης μαζικοί κλώνοι HC11-L1 παράγουν όγκους σε μεγαλύτερο ποσοστό (4/7 ποντίκια) συγκριτικά με τα κύτταρα HC11-VL30 (1/7 ποντίκια). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ρετροτρανσποζόνια VL30, δύναται να οδηγήσουν σε ογκογένεση, καθιστώντας τα κύτταρα HC11-VL30 ικανά νεοπλασματικής ανάπτυξης, έστω και σε χαμηλότερη συχνότητα από ότι τα κύτταρα HC11-L1. **β.** Τα παραγόμενα νεοπλάσματα χαρακτηρίστηκαν ως συμπαγή αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα χωρίς την παρουσία φυσιολογικών αδενικών σχηματισμών του μαστικού αδένου (χαμηλής διαφοροποίησης). **γ.** Η ανάλυση των τομών παραφίνης όγκων στην περίπτωση των κυττάρων HC11-VL30 πιστοποίησε τα χαρακτηριστικά κακοήθους νεοπλασίας, όπως στοιχειοθετήθηκε με την παρουσία κυττάρων με επιμήκεις και πολυμορφικούς πυρήνες και πολλαπλούς πυρηνίσκους (χαρακτηριστικά γνωρίσματα γενωμικής αστάθειας) (Εικόνα 27). Τα κύτταρα αυτά είχαν την τάση να διηθούν τον λιπώδη και μυϊκό ιστό. Ακόμη σε τομές που ελήφθησαν από το όγκο ανιχνεύθηκαν θέσεις συμπαγών αθροίσεων κυττάρων, που ήταν θετικές ως προς την πρωτεΐνη παν-κερατίνη (Εικόνα 28), γεγονός που επιβεβαιώνει το δυναμικό μερίδας νεοπλασματικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σχηματίζοντας νέους όγκους. **δ.** Τα κύτταρα μάρτυρες HC11 δεν δύναται να παράγουν όγκους σε ποντίκια ακόμα και 4 μήνες μετά από την ένεση σε αυτά. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί η σπουδαιότητα

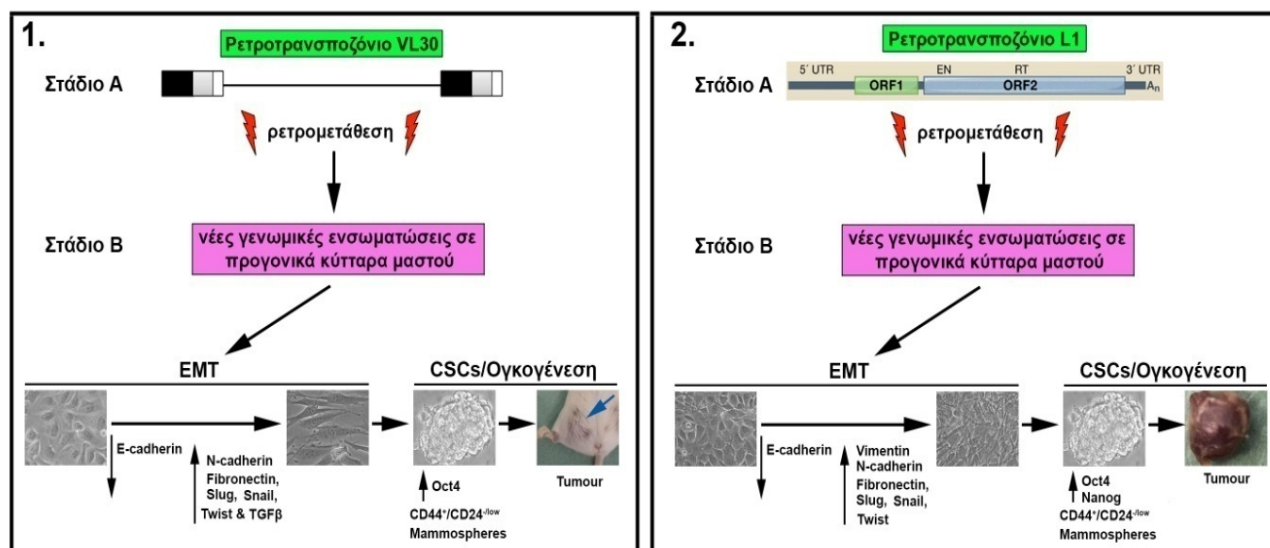
της ικανότητας των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων να παράγουν όγκους σε συγγενικά ποντίκια Balb/c, καθώς το ενεργό ανοσοποιητικό τους σύστημα βοηθά τον οργανισμό να αμυνθεί στην επαγωγή κακοήθειας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή μαρτυρία που ενισχύει την επιθετική καρκινική συμπεριφορά των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 και HC11-L1. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι ένας αριθμός ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού της τάξεως των 0.5×10^6 άνευ διαλογής σε κύτταρα με τον φαινότυπο $CD24^{-low}/CD44^{+}$ (unsorted for the $CD24^{-low}/CD44^{+}$ phenotype) ήταν ικανός να παράξει όγκους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (NOD/SCID) σε 4-6.5 μήνες (250). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα που ενέθηκαν στα ποντίκια περιέχουν κύτταρα με το φαινότυπο $CD24^{-low}/CD44^{+}$ θα περιμέναμε αύξηση του ποσοστού ογκογένεσης εάν το πείραμα πραγματοποιείτο σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια NOD/SCID.

Τέλος, τα απομονωμένα κύτταρα από όγκους HC11-L1 παρουσίασαν μεσεγχυματική μορφολογία και σχημάτισαν μαμμόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης προσκόλλησης, μια πολύ σημαντική μαρτυρία ότι τα κύτταρα όγκων, διατηρούν την ικανότητα των κυττάρων μαζικών κλώνων HC11-L1 να παράγουν μαμμόσφαιρες, συντηρώντας ένα πληθυσμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων στον όγκο (Εικόνα 30). Επιπλέον, η θετικότητα των απομονωμένων κυττάρων ως προς τα γεγονότα ρετρομετάθεσης επιβεβαιώθηκε σε γενωμικό επίπεδο με PCR (Εικόνα 31), όπου σημειώθηκε η παρουσία των δύο διαγνωστικών προϊόντων ρετρομετάθεσης 1243 και 342 bp. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τις πρόσφατες μελέτες που υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός υποπληθυσμού καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσα σε ένα όγκο, τα οποία χαρακτηρίζονται ως κύτταρα έναρξης όγκου (tumor initiating cells), ικανών να αυτοανανεώνονται διατηρώντας τον εαυτό τους αλλά και να διαφοροποιούνται δίνοντας γένεση σε νέους όγκους.

Τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην ρετρομετάθεση, στην επαγωγή EMT, καρκινικών βλαστικών κυττάρων και καρκινογένεσης. Συνολικά, προτείνουμε ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων VL30 και L1, με τον ταυτόχρονο υψηλό αριθμό γενωμικών ενσωματώσεων αποτελεί ένα νέο μηχανισμό επαγωγής της μετάπτωσης EMT και παραγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε επιθηλιακά προγονικά κύτταρα ποντικού. Επιπλέον, δεδομένου

ότι η επαγωγή EMT στην ενήλικη ζωή συνδέεται κυρίως με παθολογικές καταστάσεις και με καρκινογένεση, η επαγωγή EMT στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 συμφωνεί με την υπάρχουσα θεωρία που υποστηρίζει ότι η καρκινογένεση προκύπτει από μεταλλάξεις σε βλαστικά και προγονικά κύτταρα ενός ιστού.

Τέλος, ο καρκίνος μαστού αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες και την δεύτερη αιτία θανάτου γυναικών παγκοσμίως (280, 281). Βιβλιογραφικά, έχει προταθεί η υπόθεση εμπλοκής των ρετροτρανσποζονίων L1 στην ογκογένεση και εξέλιξη του καρκίνου και έχουν αποδειχθεί μεταθέσεις των L1 σε επιθηλιακούς όγκους (76). Αξιοσημείωτα, βασιζόμενοι στις επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης του μη αυτόνομου ενδογενούς ρετροϊού στο γένωμα του ποντικού VL30, προτείνουμε παράλληλα ότι πέραν των αυτόνομων ρετροτρανσποζονίων L1, εάν οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (HERVs) έχουν το δυναμικό να ρετρομετατίθενται και να προκαλούν ογκογένεση, η αναστολή της ρετρομετάθεσης θα μπορούσε να αποτελεί μια νέα και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση θεραπείας του καρκίνου μαστού.



Εικόνα 4.1: Γραφική παρουσίαση επιπτώσεων της ρετρομετάθεσης VL30 (1) και L1 (2) στα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού HC11.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ρετροτρανσποζόνια είναι αλληλουχίες DNA και συνιστούν σχεδόν το μισό γένωμα των θηλαστικών. Είναι δε ικανές να μετατίθενται και μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης, τα νέα ρετροτρανσποζονιακά αντίγραφα ενσωματώνονται τυχαία σε νέες θέσεις στο γένωμα οδηγώντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης αλλά και σε αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Βιβλιογραφικά, έχουν αναφερθεί 65 ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με τη δράση των ρετροτρανσποζονίων. Οι ενδογενείς ρετροϊοί (LTR-ρετροτρανσποζόνια) αποτελούν το 8% του γενώματος του ποντικού, ενώ οι μακρές διάσπαρτες αλληλουχίες LINE το 19.2%. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει αποδειχθεί ότι το ρετροτρανσποζόνιο VL30, με τη χαρακτηριστική τυπική δομή των ρετροϊών, είναι ρετρομεταθετικά ενεργό. Η σπουδαιότητα των ρετροτρανσποζονίων VL30 έγκειται στο γεγονός ότι αποτελούν ανάλογες αλληλουχίες των ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊών (HERVs), που αποτελούν το ~10% του ανθρώπινου γενώματος.

Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT) εμφανίζεται κυρίως κατά την φυσιολογική εμβρυονική ανάπτυξη, ενώ η επαγωγή της στην ενήλικη ζωή συμβάλλει στην καρκινογένεση μέσω των φαινομένων της διήθησης και μετάστασης. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) είναι καρκινικά κύτταρα με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την δυνατότητα τους να αναπαράγουν νέους όγκους. Βιβλιογραφικά δεδομένα προτείνουν τη συσχέτιση μεταξύ της επαγωγής EMT και καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.

Σκοπός της διατριβής αυτής αποτέλεσε η διερεύνηση δύο κρίσιμων ερωτημάτων, εάν: **1.** γεγονότα ρετρομετάθεσης συμβαίνουν σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού και κυρίως, **2.** οι επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης συσχετίζονται με EMT.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι επιπτώσεις των γεγονότων ρετρομετάθεσης σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού με δύο προσεγγίσεις: **α.** με τη διαμόλυνση του ρετροτρανσποζονίου VL30, ενός μη αυτόνομου LTR- ρετροτρανσποζονίου, σε προγονικά και διαφοροποιημένα κύτταρα μαστού ποντικού και **β.** με τη διαμόλυνση του VL30 ή ενός μη-LTR ενεργού ανθρώπινου ρετροτρανσποζονίου L1 ή του ρετροϊού MoMLV (ως LTR ρετροτρανσποζόνιο) σε προγονικά κύτταρα μαστού ποντικού.

Τα κύρια ευρήματα της παρούσας διατριβής είναι τα ακόλουθα:

1. Η διαμόλυνση του μη-αυτόνομου ρετροτρανσποζονίου VL30 σε προγονικά κύτταρα μαστού ποντικού HC11 οδήγησε στην παραγωγή υψηλότερης συχνότητας ρετρομετάθεσης, συγκριτικά με τα διαφοροποιημένα κύτταρα μαστού C127 και EPH4 (J3B1A). Επίσης, η διαμόλυνση του ρετροτρανσποζονίου L1 και του ρετροϊού MoMLV ως ρετροτρανσποζόνιο (DO.MT-EGFP) σε κύτταρα HC11 παράγαγε γεγονότα ρετρομετάθεσης υψηλής συχνότητας.

2. Σε αντίθεση με τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα C127 και EPH4, τα οποία διατήρησαν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο, αντιπροσωπευτικοί κυτταρικοί κλώνοι HC11-VL30 απέκτησαν ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο. Παρομοίως, μεσεγχυματική μορφολογία παρουσίασαν και οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι HC11-L1, σε αντίθεση με τους κλώνους HC11-DO.MT στους οποίους δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μορφολογικές διαφορές.

3. Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος που παρατηρήθηκε στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους HC11-VL30 συνοδευόταν από: την πλήρη απώλεια έκφρασης της E-καντερίνης, ενός διάχυτου πρότυπου εντοπισμού της β-κατενίνης στο εσωτερικό των κυττάρων, επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης N-καντερίνης και φμπρονεκτίνης καθώς και της RNA έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Snail, Twist, Slug και της κυτοκίνης TGF-β1. Παράλληλα, τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα HC11-L1 παρουσίασαν ένα παρόμοιο προφίλ έκφρασης των παραπάνω δεικτών EMT, όπως τα κύτταρα HC11-VL30, με εξαίρεση τη TGF-β1 όπου δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή στην RNA έκφρασή της.

4. Τα θετικά ρετρομετάθεσης και με επαγμένη EMT κύτταρα HC11-VL30 και HC11-L1 χαρακτηρίστηκαν από αυξημένο μεταστατικό δυναμικό συγκριτικά με τα κύτταρα HC11, ικανότητα διήθησης σε γέλη matrigel και σχηματισμό αποικιών σε μαλακό άγαρ.

5. Κύτταρα κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 με επαγμένη EMT ήταν ικανά ανάπτυξης υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού και σχημάτιζαν μαμμόσφαιρες όταν καλλιεργήθηκαν σε μέσα μειωμένης προσκόλλησης.

6. Κύτταρα προερχόμενα από μαμμόσφαιρες κλώνων HC11-VL30 και HC11-L1 χαρακτηρίστηκαν θετικά ως προς: **6α.** τον αντιγονικό φαινότυπο των

καρκινικών βλαστικών κυττάρων CD44⁺/CD24^{-low}, **6β.** επαγωγή έκφρασης RNA του γονιδίου *Oct4* και **6γ.** ικανότητες αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης. Επιπλέον, παρουσιάστηκαν δύο χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων μαμμοσφαιρών HC11-L1 και μαμμοσφαιρών HC11-VL30: **6δ.** μόνο οι μαμμόσφαιρες HC11-L1 χαρακτηρίστηκαν από αυξημένη έκφραση RNA του γονιδίου *Nanog* και **6ε.** ενώ τα κύτταρα μαμμοσφαιρών HC11-VL30 διαφοροποιήθηκαν σε δομές που ομοιάζαν με αυτές του γαλακτοφόρου αδένου, τα κύτταρα μαμμοσφαιρών HC11-L1 διαφοροποιήθηκαν σε κυτταρικές δομές αποτελούμενες κυρίως από μεσεγχυματικά κύτταρα και σε μικρότερο ποσοστό από επιθηλιακά.

7. Η ένεση θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων HC11-VL30 και HC11-L1 στα συγγενικά ποντίκια Balb/c οδήγησε στη παραγωγή όγκων. Τα νεοπλάσματα χαρακτηρίστηκαν ως συμπαγή αδιαφοροποίητα με ένα διάχυτο κυρίως ή κατά θέσεις συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης, χωρίς την παρουσία αδενικών σχηματισμών. Στην περίπτωση νεοπλάσματος από κύτταρα HC11-VL30, οι συμπαγείς αθροίσεις νεοπλασματικών κυττάρων χαρακτηρίστηκαν, κατά θέσεις, από θετικότητα ως προς την πρωτεΐνη πανκερατίνη υποδηλώνοντας εστιακή επιθηλιακή διαφοροποίηση.

8. Τα απομονωμένα καρκινικά κύτταρα από νεοπλάσματα HC11-L1 παρουσίασαν μεσεγχυματική μορφολογία και ικανότητα σχηματισμού μαμμοσφαιρών, υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. Επιπρόσθετα, ανάλυση PCR πιστοποίησε τη θετικότητα των κυττάρων ως προς τα γεγονότα ρετρομετάθεσης.

Η σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής συνοψίζεται στα ακόλουθα:

A. η ρετρομετάθεση των VL30 αποτελεί ένα αξιόπιστο μοντέλο για την *in vitro* μελέτη του καρκίνου,

B. η ρετρομετάθεση των VL30 και L1 ενεργοποιεί ρυθμιστικά μεταγραφικά μονοπάτια και παράλληλα, ως ένα φαινόμενο μεταλλαξιγένεσης συνδέεται με την επαγωγή EMT και παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων και,

Γ. τα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού αποτελούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον επαγωγής EMT, καρκινικών βλαστικών κυττάρων και ογκογένεσης μέσω της ρετρομετάθεσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ: Η παρούσα εργασία παρέχει μια νέα πτυχή/διάσταση επαγωγής/πρόκλησης καρκίνου μαστού μέσω της ρετρομετάθεσης σε προγονικά κύτταρα. Αναφορικά με τα ρετροτρανσποζόνια VL30, ως ενδογενείς ρετροϊοί, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα αντιπροσωπευτικό μοντέλο μελέτης των ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊών HERV, ως ένα γενωμικά-εγγενή αιτιολογικό παράγοντα ανάπτυξης καρκίνου μαστού.

Correlation of retrotransposition with Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)

Retrotransposons are DNA sequences accounting for almost half of the mammalian genome. They are able to transpose and following retrotransposition, new retrotransposon copies are randomly integrated into new genomic loci. Such new integrations reshuffle the genome and alter gene expression. Notably, 65 known human diseases, including several types of cancer, have been associated with retrotransposon copy-insertional mutagenesis. Endogenous retrovirus-like sequences (LTR-retrotransposons) account for ~8%, while that of LINE sequences comprise 19.2% of the mouse genome. Previously, we have shown that VL30s, having the typical retroviral structure, are retrotransposition-active. The importance of VL30 elements is that they are analogue sequences of human endogenous retroviruses (HERVs), accounting for ~10% of the human genome.

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) occurs mainly in the normal embryonic development but also participates in cancer progression through the processes of invasion and metastasis. Cancer Stem Cells (CSCs) are cancer cells with stem-like properties, having the potential to produce tumors. An association between EMT and acquisition of cancer stem-cell properties or a co-operation of CSCs and EMT in development of breast cancer has been proposed.

Aim of the present dissertation was to investigate two crucial questions, whether: **1.** retrotransposition events occur in mammary epithelial cells, and mainly **2.** the outcome of retrotransposition is associated with EMT, which are currently unknown.

In this study, the outcome of retrotransposition in mouse mammary cells was examined by two approaches: **a.** the transfection of a non-autonomous Viral-Like 30 element (VL30) in progenitor and differentiated mouse mammary cells, and **b.** the transfection of retrotransposon VL30 or a non-LTR human active L1 retrotransposon or retrovirus MoMLV (as LTR retrotransposon) in progenitor mouse mammary cells.

The major findings of this work are:

1. The transfection of the non-autonomous VL30 retrotransposon in progenitor HC11 mouse mammary cells produced a higher retrotransposition frequency,

in comparison to that of differentiated epithelial breast C127 and EPH4 (J3B1A) cells. Also, the transfection of retrotransposon L1 or retrovirus MoMLV (DO.MT-EGFP) in HC11 cells produced high retrotransposition frequencies.

2. In contrast to the retrotransposition-positive C127 and EPH4 cells, which retained their epithelial phenotype, representative retrotransposition-positive HC11-VL30 clone cells acquired a mesenchymal phenotype. Similarly, retrotransposition-positive HC11-L1 cell clones showed a mesenchymal phenotype, as HC11-VL30 ones, but no particular phenotypic changes were observed in HC11-DO.MT clones.

3. The mesenchymal phenotype observed in the retrotransposition- positive HC11-VL30 cells was accompanied by: **a.** a complete loss of E-cadherin expression, **b.** a diffuse localization pattern for β -catenin, **c.** induction of N-cadherin and fibronectin protein expression and **d.** RNA expression of the transcriptional factors Snail, Twist, Slug, and the cytokine TGF- β 1. In parallel, the retrotransposition-positive HC11-L1 cells exhibited a similar expression profile for these EMT-markers, as HC11-VL30 cells, with the exception that of TGF- β where no significant changes were observed in its RNA expression.

4. The retrotransposition- and EMT-positive HC11-VL30 and HC11-L1 cells were characterized by an increased metastatic potential, compared to HC11-control cells, invasion ability in matrigel and colony formation in soft agar.

5. The EMT-positive HC11-VL30 and HC11-L1 cells could grow in low serum and form mammospheres under anchorage-independent cell culture conditions.

6. Cells deriving either from HC11-VL30 or HC11-L1 mammospheres exhibited: **a.** a CD44⁺/CD24^{-/low} antigenic CSCs-phenotype, **b.** induction of Oct4 RNA expression, and **c.** self-renewal and differentiation properties. In addition, two distinct differences were observed between HC11-VL30 and HC11-L1 mammosphere cells: **d.** only the HC11-L1 mammosphere cells were characterized by induced Nanog RNA expression, and **e.** whereas the HC11-VL30 mammosphere cells were differentiated to mammary acini-like structures, the respective HC11-L1 mammospheres gave rise mainly to mesenchymal cell structures and to a lesser percentage of epithelial cells.

7. Injection of retrotransposition-positive HC11-VL30 and HC11-L1 cells into syngeneic Balb/c mice produced tumours. Tumours section analysis revealed a

phenotype of undifferentiated solid neoplasms with a generally diffuse growth pattern, and in some sites tumour cells were arranged in cohesive clusters without an obvious glandular differentiation. In HC11-VL30 tumour sections, cohesive clusters of tumour cells were positive for pancytokeratin expression.

8. Isolated tumour cells from HC11-L1 neoplasms exhibited a mesenchymal morphology and were able to form mammospheres under low-binding growth conditions. In addition PCR analysis confirmed that HC11-L1 tumour cells were retrotransposition-positive.

The significance of this study is demonstrated by the following:

A. VL30 retrotransposition is a trustworthy molecular model/tool for studying cancer in vitro.

B. VL30 and L1 retrotransposition activates regulatory transcription networks and, as a mutagenic phenomenon, is linked with the induction of EMT and CSCs generation.

C. Breast epithelial progenitors are an amenable cellular environment/target for retrotransposition-induced EMT, -CSCs and tumour development.

FINAL CONCLUSION: This research provides a new concept on breast cancer development through retrotransposition in progenitor cells. As regards VL30s, as endogenous retroviral sequences, they might represent a model for studying human endogenous retroviruses HERVs as a genomically-intrinsic etiological factor for human breast cancer.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ray DA, Walker JA, Batzer MA. Mobile element-based forensic genomics. *Mutation research*. 2007;616(1-2):24-33. Epub 2006/12/13.
2. Kazazian HH, Jr. Mobile elements and disease. *Current opinion in genetics & development*. 1998;8(3):343-50. Epub 1998/08/05.
3. Bohne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2008;16(1):203-15. Epub 2008/02/23.
4. Thornburg BG, Gotea V, Makalowski W. Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals. *Gene*. 2006;365:104-10. Epub 2005/12/27.
5. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10.
6. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):520-62. Epub 2002/12/06.
7. Goodier JL, Kazazian HH, Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. 2008;135(1):23-35. Epub 2008/10/16.
8. Ravindran S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(50):20198-9. Epub 2012/12/14.
9. Biemont C, Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 2006;443(7111):521-4. Epub 2006/10/07.
10. Kajikawa M, Okada N. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell*. 2002;111(3):433-44. Epub 2002/11/07.
11. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature genetics*. 2003;35(1):41-8. Epub 2003/08/05.
12. Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *American journal of human genetics*. 2003;73(6):1444-51. Epub 2003/11/25.
13. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HH, Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(6):651-8. Epub 2003/11/26.
14. Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome research*. 2002;12(10):1455-65. Epub 2002/10/09.
15. Hagan CR, Rudin CM. Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy: potential clinical implications. *American journal of pharmacogenomics :*

genomics-related research in drug development and clinical practice. 2002;2(1):25-35. Epub 2002/06/27.

16. Kazazian HH, Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 2004;303(5664):1626-32. Epub 2004/03/16.

17. Nigumann P, Redik K, Matlik K, Speek M. Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics*. 2002;79(5):628-34. Epub 2002/05/07.

18. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(6):1973-85. Epub 2001/03/10.

19. Goodier JL, Ostertag EM, Du K, Kazazian HH, Jr. A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome research*. 2001;11(10):1677-85. Epub 2001/10/10.

20. DeBerardinis RJ, Goodier JL, Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Rapid amplification of a retrotransposon subfamily is evolving the mouse genome. *Nature genetics*. 1998;20(3):288-90. Epub 1998/11/07.

21. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome research*. 2008;18(3):343-58. Epub 2008/02/08.

22. Perepelitsa-Belancio V, Deininger P. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nature genetics*. 2003;35(4):363-6. Epub 2003/11/20.

23. Alisch RS, Garcia-Perez JL, Muotri AR, Gage FH, Moran JV. Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes & development*. 2006;20(2):210-24. Epub 2006/01/19.

24. Martin SL. The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(1):45621. Epub 2006/08/01.

25. Kulpa DA, Moran JV. Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(7):655-60. Epub 2006/06/20.

26. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5280-5. Epub 2003/04/19.

27. Beauregard A, Curcio MJ, Belfort M. The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Annual review of genetics*. 2008;42:587-617. Epub 2008/08/06.

28. Rodic N, Burns KH. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS genetics*. 2013;9(3):e1003402. Epub 2013/04/05.

29. Bestor TH. Cytosine methylation mediates sexual conflict. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19(4):185-90. Epub 2003/04/10.
30. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *Journal of molecular biology*. 2006;357(5):1383-93. Epub 2006/02/24.
31. Han JS, Boeke JD. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2005;27(8):775-84. Epub 2005/07/15.
32. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. *Nucleic acids research*. 2006;34(5):1512-21. Epub 2006/03/24.
33. Belancio VP, Roy-Engel AM, Pochampally RR, Deininger P. Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. *Nucleic acids research*. 2010;38(12):3909-22. Epub 2010/03/11.
34. Han JS, Szak ST, Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*. 2004;429(6989):268-74. Epub 2004/05/21.
35. Szak ST, Pickeral OK, Makalowski W, Boguski MS, Landsman D, Boeke JD. Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome biology*. 2002;3(10):research0052. Epub 2002/10/10.
36. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002;110(3):315-25. Epub 2002/08/15.
37. Symer DE, Connelly C, Szak ST, Caputo EM, Cost GJ, Parmigiani G, et al. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*. 2002;110(3):327-38. Epub 2002/08/15.
38. Cost GJ, Boeke JD. Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry*. 1998;37(51):18081-93. Epub 1999/01/28.
39. Kines KJ, Belancio VP. Expressing genes do not forget their LINES: transposable elements and gene expression. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1329-44. Epub 2011/12/29.
40. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger P. The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene*. 2008;411(1-2):38-45. Epub 2008/02/12.
41. Wheelan SJ, Aizawa Y, Han JS, Boeke JD. Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution. *Genome research*. 2005;15(8):1073-8. Epub 2005/07/19.
42. Belancio VP, Whelton M, Deininger P. Requirements for polyadenylation at the 3' end of LINE-1 elements. *Gene*. 2007;390(1-2):98-107. Epub 2006/10/07.
43. Moran JV, DeBerardinis RJ, Kazazian HH, Jr. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science*. 1999;283(5407):1530-4. Epub 1999/03/05.

44. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H. Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3220-5. Epub 2006/02/24.
45. Zhang Z, Harrison PM, Liu Y, Gerstein M. Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome research*. 2003;13(12):2541-58. Epub 2003/12/06.
46. Tang W, Gunn TM, McLaughlin DF, Barsh GS, Schlossman SF, Duke-Cohan JS. Secreted and membrane attractin result from alternative splicing of the human ATRN gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(11):6025-30. Epub 2000/05/17.
47. Burwinkel B, Kilimann MW. Unequal homologous recombination between LINE-1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease. *Journal of molecular biology*. 1998;277(3):513-7. Epub 1998/05/23.
48. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger PL. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Seminars in cancer biology*. 2010;20(4):200-10. Epub 2010/07/06.
49. Wallace NA, Belancio VP, Deininger PL. L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity. *Gene*. 2008;419(1-2):75-81. Epub 2008/06/17.
50. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009;139(6):1069-83. Epub 2009/12/08.
51. Lyon MF. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenetics and cell genetics*. 1998;80(1-4):133-7. Epub 1998/07/25.
52. Chow JC, Ciaudo C, Fazzari MJ, Mise N, Servant N, Glass JL, et al. LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell*. 2010;141(6):956-69. Epub 2010/06/17.
53. Babushok DV, Kazazian HH, Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Human mutation*. 2007;28(6):527-39. Epub 2007/02/20.
54. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2011;12:187-215. Epub 2011/08/02.
55. Kaer K, Speek M. Retroelements in human disease. *Gene*. 2013;518(2):231-41. Epub 2013/01/22.
56. Hancks DC, Kazazian HH, Jr. Active human retrotransposons: variation and disease. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(3):191-203. Epub 2012/03/13.
57. 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 research*. 1992;52(3):643-5. Epub 1992/02/01.

58. 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;466(7307):769-73. Epub 2010/08/06.
59. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH, Jr. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*. 1996;87(5):917-27. Epub 1996/11/29.
60. Ostertag EM, Prak ET, DeBerardinis RJ, Moran JV, Kazazian HH, Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic acids research*. 2000;28(6):1418-23. Epub 2000/02/24.
61. Garcia-Perez JL, Marchetto MC, Muotri AR, Coufal NG, Gage FH, O'Shea KS, et al. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Human molecular genetics*. 2007;16(13):1569-77. Epub 2007/05/01.
62. Kano H, Godoy I, Courtney C, Vetter MR, Gerton GL, Ostertag EM, et al. L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes & development*. 2009;23(11):1303-12. Epub 2009/06/03.
63. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Yeo GW, Mu Y, Lovci MT, et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*. 2009;460(7259):1127-31. Epub 2009/08/07.
64. Kubo S, Seleme MC, Soifer HS, Perez JL, Moran JV, Kazazian HH, Jr., et al. L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(21):8036-41. Epub 2006/05/16.
65. Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, 3rd, et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science*. 2012;337(6097):967-71. Epub 2012/06/30.
66. 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;333(6168):87-90. Epub 1988/05/05.
67. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991;253(5020):661-5. Epub 1991/08/09.
68. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*. 1991;251(4999):1366-70. Epub 1991/03/15.
69. Solyom S, Ewing AD, Rahrman EP, Doucet T, Nelson HH, Burns MB, et al. Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome research*. 2012;22(12):2328-38. Epub 2012/09/13.
70. Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, Neuwald AF, et al. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell*. 2010;141(7):1253-61. Epub 2010/07/07.

71. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters*. 1995;358(1):1-3. Epub 1995/01/16.
72. Giorgi G, Marcantonio P, Del Re B. LINE-1 retrotransposition in human neuroblastoma cells is affected by oxidative stress. *Cell and tissue research*. 2011;346(3):383-91. Epub 2011/12/14.
73. Maxwell PH, Burhans WC, Curcio MJ. Retrotransposition is associated with genome instability during chronological aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(51):20376-81. Epub 2011/10/25.
74. Laurie CC, Laurie CA, Rice K, Doheny KF, Zelnick LR, McHugh CP, et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nature genetics*. 2012;44(6):642-50. Epub 2012/05/09.
75. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodriguez-Santiago B, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nature genetics*. 2012;44(6):651-8. Epub 2012/05/09.
76. Carreira PE, Richardson SR, Faulkner GJ. L1 retrotransposons, cancer stem cells and oncogenesis. *The FEBS journal*. 2014;281(1):63-73. Epub 2013/11/30.
77. Shukla R, Upton KR, Munoz-Lopez M, Gerhardt DJ, Fisher ME, Nguyen T, et al. Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell*. 2013;153(1):101-11. Epub 2013/04/02.
78. Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A, et al. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nature cell biology*. 2013;15(3):274-83. Epub 2013/02/26.
79. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell*. 2010;7(1):51-63. Epub 2010/07/14.
80. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. Epub 2006/08/15.
81. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11. Epub 2001/11/02.
82. Zhu L, Gibson P, Curre DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature*. 2009;457(7229):603-7. Epub 2008/12/19.
83. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Goktuna SI, Ziegler PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013;152(1-2):25-38. Epub 2013/01/01.
84. Wissing S, Munoz-Lopez M, Macia A, Yang Z, Montano M, Collins W, et al. Reprogramming somatic cells into iPS cells activates LINE-1 retroelement mobility. *Human molecular genetics*. 2012;21(1):208-18. Epub 2011/10/13.

85. Baba Y, Huttenhower C, Noshu K, Tanaka N, Shima K, Hazra A, et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Molecular cancer*. 2010;9:125. Epub 2010/05/29.
86. Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO, Wani S, Plessy C, Irvine KM, et al. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature genetics*. 2009;41(5):563-71. Epub 2009/04/21.
87. Chen L, Dahlstrom JE, Chandra A, Board P, Rangasamy D. Prognostic value of LINE-1 retrotransposon expression and its subcellular localization in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;136(1):129-42. Epub 2012/10/12.
88. Bock M, Stoye JP. Endogenous retroviruses and the human germline. *Current opinion in genetics & development*. 2000;10(6):651-5. Epub 2000/11/23.
89. Katoh I, Kurata S. Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders. *Frontiers in oncology*. 2013;3:234. Epub 2013/09/26.
90. Benachenhou F, Jern P, Oja M, Sperber G, Blikstad V, Somervuo P, et al. Evolutionary conservation of orthoretroviral long terminal repeats (LTRs) and ab initio detection of single LTRs in genomic data. *PloS one*. 2009;4(4):e5179. Epub 2009/04/15.
91. Benachenhou F, Sperber GO, Bongcam-Rudloff E, Andersson G, Boeke JD, Blomberg J. Conserved structure and inferred evolutionary history of long terminal repeats (LTRs). *Mobile DNA*. 2013;4(1):5. Epub 2013/02/02.
92. Volff JN. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2006;28(9):913-22. Epub 2006/08/29.
93. Havecker ER, Gao X, Voytas DF. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome biology*. 2004;5(6):225. Epub 2004/06/10.
94. Smit AF. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. *Nucleic acids research*. 1993;21(8):1863-72. Epub 1993/04/25.
95. Gross L. "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951;76(1):27-32. Epub 1951/01/01.
96. Maksakova IA, Romanish MT, Gagnier L, Dunn CA, van de Lagemaat LN, Mager DL. Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS genetics*. 2006;2(1):e2. Epub 2006/01/28.
97. Boeke JD, Stoye JP. Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.
98. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, et al. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Developmental cell*. 2004;7(4):597-606. Epub 2004/10/08.
99. French NS, Norton JD. Structure and functional properties of mouse VL30 retrotransposons. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1352(1):33-47. Epub 1997/05/02.

100. Nilsson M, Bohm S. Inducible and cell type-specific expression of VL30 U3 subgroups correlate with their enhancer design. *Journal of virology*. 1994;68(1):276-88. Epub 1994/01/01.
101. Hodgson CP, Fisk RZ, Arora P, Chotani M. Nucleotide sequence of mouse virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1. *Nucleic acids research*. 1990;18(3):673. Epub 1990/02/11.
102. Adams SE, Rathjen PD, Stanway CA, Fulton SM, Malim MH, Wilson W, et al. Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element. *Molecular and cellular biology*. 1988;8(8):2989-98. Epub 1988/08/01.
103. Song X, Wang B, Bromberg M, Hu Z, Konigsberg W, Garen A. Retroviral-mediated transmission of a mouse VL30 RNA to human melanoma cells promotes metastasis in an immunodeficient mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(9):6269-73. Epub 2002/04/18.
104. 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. *Journal of molecular biology*. 2007;374(1):80-90. Epub 2007/10/09.
105. 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. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2013;134(2):312-22. Epub 2013/05/28.
106. 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 radical biology & medicine*. 2012;52(10):2072-81. Epub 2012/05/01.
107. French NS, Norton JD. Analysis of retrotransposon families in genomic DNA by two-dimensional restriction mapping: detection of VL30 insertions in mouse thymic lymphoma. *Biochimica et biophysica acta*. 1994;1219(2):484-92. Epub 1994/10/18.
108. Norton JD, Hogan BL. Temporal and tissue-specific expression of distinct retrovirus-like (VL30) elements during mouse development. *Developmental biology*. 1988;125(1):226-8. Epub 1988/01/01.
109. MacManus JP, Graber T, Luebbert C, Preston E, Rasquinha I, Smith B, et al. Translation-state analysis of gene expression in mouse brain after focal ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2004;24(6):657-67. Epub 2004/06/08.
110. Costain WJ, Rasquinha I, Graber T, Luebbert C, Preston E, Slinn J, et al. Cerebral ischemia induces neuronal expression of novel VL30 mouse retrotransposons bound to polyribosomes. *Brain research*. 2006;1094(1):24-37. Epub 2006/05/30.
111. 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 research*. 2010;20(5):553-62. Epub 2010/04/14.

112. Brunmeir R, Lagger S, Simboeck E, Sawicka A, Egger G, Hagelkruys A, et al. Epigenetic regulation of a murine retrotransposon by a dual histone modification mark. *PLoS genetics*. 2010;6(4):e1000927. Epub 2010/05/06.

113. Song X, Sui A, Garen A. Binding of mouse VL30 retrotransposon RNA to PSF protein induces genes repressed by PSF: effects on steroidogenesis and oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(2):621-6. Epub 2004/01/06.

114. Song X, Sun Y, Garen A. Roles of PSF protein and VL30 RNA in reversible gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(34):12189-93. Epub 2005/08/05.

115. Urban RJ, Bodenbug Y, Kurosky A, Wood TG, Gasic S. Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450scc insulin-like growth factor response element. *Mol Endocrinol*. 2000;14(6):774-82. Epub 2000/06/10.

116. Herquel B, Ouararhni K, Martianov I, Le Gras S, Ye T, Keime C, et al. Trim24-repressed VL30 retrotransposons regulate gene expression by producing noncoding RNA. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(3):339-46. Epub 2013/02/05.

117. Doolittle WF, Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 1980;284(5757):601-3. Epub 1980/04/17.

118. Hardison RC. Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends in genetics : TIG*. 2000;16(9):369-72. Epub 2000/09/06.

119. Makalowski W. Genomics. Not junk after all. *Science*. 2003;300(5623):1246-7. Epub 2003/05/24.

120. Kidwell MG, Lisch DR. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution; international journal of organic evolution*. 2001;55(1):1-24. Epub 2001/03/27.

121. Baust C, Baillie GJ, Mager DL. Insertional polymorphisms of ETn retrotransposons include a disruption of the *wiz* gene in C57BL/6 mice. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 2002;13(8):423-8. Epub 2002/09/13.

122. . !!! INVALID CITATION !!!

123. Stankiewicz P, Shaw CJ, Withers M, Inoue K, Lupski JR. Serial segmental duplications during primate evolution result in complex human genome architecture. *Genome research*. 2004;14(11):2209-20. Epub 2004/11/03.

124. Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *American journal of human genetics*. 2003;73(4):823-34. Epub 2003/09/25.

125. Roy-Engel AM, Carroll ML, El-Sawy M, Salem AH, Garber RK, Nguyen SV, et al. Non-traditional Alu evolution and primate genomic diversity. *Journal of molecular biology*. 2002;316(5):1033-40. Epub 2002/03/09.
126. Kass DH, Batzer MA, Deininger PL. Gene conversion as a secondary mechanism of short interspersed element (SINE) evolution. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(1):19-25. Epub 1995/01/01.
127. Ejima Y, Yang L. Trans mobilization of genomic DNA as a mechanism for retrotransposon-mediated exon shuffling. *Human molecular genetics*. 2003;12(11):1321-8. Epub 2003/05/23.
128. Gray YH. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends in genetics : TIG*. 2000;16(10):461-8. Epub 2000/10/26.
129. Wimmer K, Callens T, Wernstedt A, Messiaen L. The NF1 gene contains hotspots for L1 endonuclease-dependent de novo insertion. *PLoS genetics*. 2011;7(11):e1002371. Epub 2011/11/30.
130. Goodier JL. Retrotransposition in tumors and brains. *Mobile DNA*. 2014;5:11. Epub 2014/04/09.
131. Rakyanc VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JI, Whitelaw E. Metastable epialleles in mammals. *Trends in genetics : TIG*. 2002;18(7):348-51. Epub 2002/07/20.
132. Whitelaw E, Martin DI. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nature genetics*. 2001;27(4):361-5. Epub 2001/03/30.
133. Feschotte C, Gilbert C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(4):283-96. Epub 2012/03/17.
134. Kunarso G, Chia NY, Jeyakani J, Hwang C, Lu X, Chan YS, et al. Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. *Nature genetics*. 2010;42(7):631-4. Epub 2010/06/08.
135. Sverdlov ED. Perpetually mobile footprints of ancient infections in human genome. *FEBS letters*. 1998;428(1-2):1-6. Epub 1998/06/30.
136. Lowe CB, Haussler D. 29 mammalian genomes reveal novel exaptations of mobile elements for likely regulatory functions in the human genome. *PloS one*. 2012;7(8):e43128. Epub 2012/09/07.
137. 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 in genetics : TIG*. 2003;19(10):530-6. Epub 2003/10/11.
138. Ray DA, Xing J, Salem AH, Batzer MA. SINEs of a nearly perfect character. *Systematic biology*. 2006;55(6):928-35. Epub 2007/03/10.
139. Mills RE, Bennett EA, Iskow RC, Luttig CT, Tsui C, Pittard WS, et al. Recently mobilized transposons in the human and chimpanzee genomes. *American journal of human genetics*. 2006;78(4):671-9. Epub 2006/03/15.

140. Shephard EA, Chandan P, Stevanovic-Walker M, Edwards M, Phillips IR. Alternative promoters and repetitive DNA elements define the species-dependent tissue-specific expression of the FMO1 genes of human and mouse. *The Biochemical journal*. 2007;406(3):491-9. Epub 2007/06/06.
141. Lyon MF. LINE-1 elements and X chromosome inactivation: a function for "junk" DNA? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(12):6248-9. Epub 2000/06/07.
142. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(4):272-85. Epub 2007/03/17.
143. Walter J, Hutter B, Khare T, Paulsen M. Repetitive elements in imprinted genes. *Cytogenetic and genome research*. 2006;113(1-4):109-15. Epub 2006/04/01.
144. 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. *Human molecular genetics*. 2009;18(7):1221-8. Epub 2009/01/17.
145. Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*. 2005;435(7044):903-10. Epub 2005/06/17.
146. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(9):662-73. Epub 2002/09/05.
147. Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*. 2010;468(7322):443-6. Epub 2010/11/19.
148. Perng W, Mora-Plazas M, Marin C, Rozek LS, Baylin A, Villamor E. A prospective study of LINE-1 DNA methylation and development of adiposity in school-age children. *PloS one*. 2013;8(4):e62587. Epub 2013/05/03.
149. 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;30(8):1330-5. Epub 2009/06/18.
150. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate L, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 2005;24(48):7213-23. Epub 2005/09/20.
151. Fabris S, Bollati V, Agnelli L, Morabito F, Motta V, Cutrona G, et al. Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2011;6(2):188-94. Epub 2010/10/12.
152. Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human molecular genetics*. 2007;16(19):2272-80. Epub 2007/07/10.

153. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96-9. Epub 2004/08/20.
154. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915-26. Epub 1992/06/12.
155. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature genetics*. 1998;20(2):116-7. Epub 1998/10/15.
156. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57. Epub 1999/11/11.
157. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(11):1068-75. Epub 2004/10/07.
158. Svoboda P, Stein P, Anger M, Bernstein E, Hannon GJ, Schultz RM. RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos. *Developmental biology*. 2004;269(1):276-85. Epub 2004/04/15.
159. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*. 2005;19(4):489-501. Epub 2005/02/17.
160. Fagegaltier D, Bouge AL, Berry B, Poisot E, Sismeiro O, Coppee JY, et al. The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(50):21258-63. Epub 2009/12/02.
161. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007;448(7153):553-60. Epub 2007/07/03.
162. Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, et al. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *The EMBO journal*. 2005;24(4):800-12. Epub 2005/01/29.
163. Rowe HM, Jakobsson J, Mesnard D, Rougemont J, Reynard S, Aktas T, et al. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature*. 2010;463(7278):237-40. Epub 2010/01/16.
164. Karimi MM, Goyal P, Maksakova IA, Bilenky M, Leung D, Tang JX, et al. DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs. *Cell stem cell*. 2011;8(6):676-87. Epub 2011/06/01.
165. Heras SR, Macias S, Plass M, Fernandez N, Cano D, Eyra E, et al. The Microprocessor controls the activity of mammalian retrotransposons. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(10):1173-81. Epub 2013/09/03.

166. Sijen T, Plasterk RH. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*. 2003;426(6964):310-4. Epub 2003/11/25.
167. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*. 2008;453(7194):539-43. Epub 2008/04/12.
168. Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(9):615-27. Epub 2011/08/19.
169. Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, et al. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*. 2008;453(7196):798-802. Epub 2008/05/09.
170. Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*. 2009;136(4):656-68. Epub 2009/02/26.
171. Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzic M, Becker JD, Feijo JA, et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*. 2009;136(3):461-72. Epub 2009/02/11.
172. Best S, Le Tissier PR, Stoye JP. Endogenous retroviruses and the evolution of resistance to retroviral infection. *Trends in microbiology*. 1997;5(8):313-8. Epub 1997/08/01.
173. Bieniasz PD. Restriction factors: a defense against retroviral infection. *Trends in microbiology*. 2003;11(6):286-91. Epub 2003/06/26.
174. Goff SP. Retrovirus restriction factors. *Molecular cell*. 2004;16(6):849-59. Epub 2004/12/22.
175. Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, et al. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature*. 2005;433(7024):430-3. Epub 2005/01/28.
176. Floyd JA, Gold DA, Concepcion D, Poon TH, Wang X, Keithley E, et al. A natural allele of *Nxf1* suppresses retrovirus insertional mutations. *Nature genetics*. 2003;35(3):221-8. Epub 2003/10/01.
177. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nature genetics*. 2013;45(9):977-83. Epub 2013/07/16.
178. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, et al. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nature genetics*. 2013;45(9):970-6. Epub 2013/07/16.
179. Liu C, Zhang X, Huang F, Yang B, Li J, Liu B, et al. APOBEC3G inhibits microRNA-mediated repression of translation by interfering with the interaction between Argonaute-2 and MOV10. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(35):29373-83. Epub 2012/07/14.
180. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, et al. Two mouse piwi-related genes: *miwi* and *mili*. Mechanisms of development. 2001;108(1-2):121-33. Epub 2001/10/02.

181. Freeman P, Macfarlane C, Collier P, Jeffreys AJ, Badge RM. L1 hybridization enrichment: a method for directly accessing de novo L1 insertions in the human germline. *Human mutation*. 2011;32(8):978-88. Epub 2011/05/12.
182. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research*. 2005;65(14):5991-5; discussion 5. Epub 2005/07/19.
183. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1796(2):75-90. Epub 2009/03/25.
184. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews*. 2009;28(1-2):15-33. Epub 2009/01/27.
185. Scheel C, Onder T, Karnoub A, Weinberg RA. Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer research*. 2007;67(24):11476-9; discussion 9-80. Epub 2007/12/20.
186. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(6):442-54. Epub 2002/08/22.
187. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(2):131-42. Epub 2006/02/24.
188. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8. Epub 2009/06/03.
189. Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*. 2012;125(14):1795-808. Epub 2012/04/12.
190. Esteban MA, Bao X, Zhuang Q, Zhou T, Qin B, Pei D. The mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(5):423-8. Epub 2012/10/23.
191. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(3):178-96. Epub 2014/02/22.
192. Guarino M. Epithelial-to-mesenchymal change of differentiation. From embryogenetic mechanism to pathological patterns. *Histology and histopathology*. 1995;10(1):171-84. Epub 1995/01/01.
193. Guarino M, Micheli P, Pallotti F, Giordano F. Pathological relevance of epithelial and mesenchymal phenotype plasticity. *Pathology, research and practice*. 1999;195(6):379-89. Epub 1999/07/10.
194. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*. 2005;17(5):548-58. Epub 2005/08/16.
195. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal

transition. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(32):23337-47. Epub 2007/06/15.

196. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(35):13180-5. Epub 2006/08/23.

197. Jechlinger M, Grunert S, Beug H. Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2002;7(4):415-32. Epub 2003/07/29.

198. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90. Epub 2009/12/01.

199. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer*. 2007;7(6):415-28. Epub 2007/05/18.

200. Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(11):4875-87. Epub 2008/09/19.

201. Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P, van Laar T. Snail and Slug, key regulators of TGF-beta-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;435(1):58-63. Epub 2013/04/27.

202. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer cell*. 2008;14(1):79-89. Epub 2008/07/05.

203. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & development*. 2006;20(23):3199-214. Epub 2006/12/13.

204. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research*. 2008;68(10):3645-54. Epub 2008/05/17.

205. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007;39(3):305-18. Epub 2007/06/15.

206. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(23):3756-88. Epub 2008/08/30.

207. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(8):622-34. Epub 2005/07/19.

208. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast cancer research : BCR*. 2003;5(6):R217-22. Epub 2003/10/29.

209. Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Current opinion in cell biology*. 2005;17(5):499-508. Epub 2005/08/19.
210. Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;92(3):404-8. Epub 2001/04/06.
211. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British journal of cancer*. 2006;94(5):661-71. Epub 2006/02/24.
212. Dumont N, Wilson MB, Crawford YG, Reynolds PA, Sigaroudinia M, Tlsty TD. Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(39):14867-72. Epub 2008/09/23.
213. Wells A, Yates C, Shepard CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clinical & experimental metastasis*. 2008;25(6):621-8. Epub 2008/07/05.
214. Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, Jansen C, van Bokhoven A, Schalken JA. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;241(2):453-8. Epub 1998/01/13.
215. Asli NS, Harvey RP. Epithelial to mesenchymal transition as a portal to stem cell characters embedded in gene networks. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2013;35(3):191-200. Epub 2012/09/19.
216. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer research*. 2002;62(6):1613-8. Epub 2002/03/26.
217. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 3):499-511. Epub 2003/01/01.
218. Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(16):4769-76. Epub 2007/08/19.
219. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005;132(14):3151-61. Epub 2005/06/29.
220. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*. 2004;48(5-6):365-75. Epub 2004/09/07.

221. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, et al. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2001;20(29):3814-23. Epub 2001/07/06.
222. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrío D, Locascio A, Cano A, Palacios J, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002;21(20):3241-6. Epub 2002/06/26.
223. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103(8):1631-43. Epub 2005/03/03.
224. Tripathi MK, Misra S, Khedkar SV, Hamilton N, Irvin-Wilson C, Sharan C, et al. Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(17):17163-71. Epub 2005/03/01.
225. Fuxe J, Karlsson MC. TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(5-6):455-61. Epub 2012/05/26.
226. Moustakas A, Heldin P. TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(8):2621-34. Epub 2014/02/25.
227. Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology*. 2009;11(8):943-50. Epub 2009/07/15.
228. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117(7):927-39. Epub 2004/06/24.
229. Thiery JP, Morgan M. Breast cancer progression with a Twist. *Nature medicine*. 2004;10(8):777-8. Epub 2004/08/03.
230. Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer research*. 2005;65(12):5153-62. Epub 2005/06/17.
231. Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, Mizumoto Y, Maida Y, Hashimoto M, et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Human pathology*. 2006;37(4):431-8. Epub 2006/03/28.
232. Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Raman V. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*. 2009;11(12):1318-28. Epub 2009/12/19.
233. Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer research*. 2005;65(23):10801-9. Epub 2005/12/03.

234. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15. Epub 2008/05/20.
235. Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer research*. 2006;66(9):4549-52. Epub 2006/05/03.
236. Tomaskovic-Crook E, Thompson EW, Thiery JP. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(6):213. Epub 2009/11/17.
237. Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer cell*. 2002;2(4):301-14. Epub 2002/10/26.
238. van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(2):121-34. Epub 2014/01/21.
239. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*. 2006;172(7):973-81. Epub 2006/03/29.
240. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10356-61. Epub 2001/08/30.
241. Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development*. 2009;23(22):2563-77. Epub 2009/11/26.
242. Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2000;5(2):227-41. Epub 2001/01/10.
243. Hennighausen L, Robinson GW. Information networks in the mammary gland. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(9):715-25. Epub 2005/10/19.
244. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On mammary stem cells. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 16):3585-94. Epub 2005/08/18.
245. Gomez-Lopez S, Lerner RG, Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(4):575-97. Epub 2013/06/19.
246. Smith GH, Medina D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *Journal of cell science*. 1988;90 (Pt 1):173-83. Epub 1988/05/01.
247. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8. Epub 1976/10/01.
248. Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(10):806-23. Epub 2009/10/02.

249. Molyneux G, Regan J, Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(24):3248-60. Epub 2007/10/24.
250. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8. Epub 2003/03/12.
251. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research*. 2005;65(13):5506-11. Epub 2005/07/05.
252. Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L, et al. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(3):R52. Epub 2008/06/11.
253. Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer*. 2006;42(9):1219-24. Epub 2006/04/21.
254. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006;442(7104):818-22. Epub 2006/07/25.
255. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(10):791-9. Epub 2007/09/14.
256. Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nature cell biology*. 2013;15(4):338-44. Epub 2013/04/04.
257. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, et al. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*. 2014;33(5):643-52. Epub 2013/01/16.
258. Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer research*. 2013;73(4):1434-44. Epub 2013/02/07.
259. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer research*. 2011;71(2):614-24. Epub 2011/01/13.
260. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(2):150-8. Epub 2007/02/20.
261. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008;456(7222):593-8. Epub 2008/12/05.
262. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-44. Epub 2011/08/23.

263. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(6):740-6. Epub 2003/12/04.
264. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*. 2003;21:759-806. Epub 2003/03/05.
265. Radisky DC, LaBarge MA. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell stem cell*. 2008;2(6):511-2. Epub 2008/06/05.
266. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*. 2008;3(8):e2888. Epub 2008/08/07.
267. Entin-Meer M, Avidan O, Hizi A. The mature reverse transcriptase molecules in virions of mouse mammary tumor virus possess protease-derived sequences. *Virology*. 2003;310(1):157-62. Epub 2003/06/06.
268. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*. 2008;14(6):818-29. Epub 2008/06/10.
269. Hayashida T, Jinno H, Kitagawa Y, Kitajima M. Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition in the establishment of breast cancer metastasis. *Journal of oncology*. 2011;2011:591427. Epub 2011/01/22.
270. Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*. 2010;9(12):2363-74. Epub 2010/06/04.
271. Tantin D. Oct transcription factors in development and stem cells: insights and mechanisms. *Development*. 2013;140(14):2857-66. Epub 2013/07/04.
272. Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2014;33(20):2655-64. Epub 2013/06/19.
273. Adissu HA, Asem EK, Lelievre SA. Three-dimensional cell culture to model epithelia in the female reproductive system. *Reprod Sci*. 2007;14(8 Suppl):11-9. Epub 2008/01/12.
274. Grosse-Wilde A, Fouquier d'Herouel A, McIntosh E, Ertaylan G, Skupin A, Kuestner RE, et al. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. *PloS one*. 2015;10(5):e0126522. Epub 2015/05/29.
275. Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(2):93-106. Epub 2013/12/25.
276. Tellez CS, Juri DE, Do K, Bernauer AM, Thomas CL, Damiani LA, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer research*. 2011;71(8):3087-97. Epub 2011/03/03.

277. Huang TH, Esteller M. Chromatin remodeling in mammary gland differentiation and breast tumorigenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(9):a004515. Epub 2010/07/09.
278. Heidmann T, Heidmann O, Nicolas JF. An indicator gene to demonstrate intracellular transposition of defective retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(7):2219-23. Epub 1988/04/01.
279. Brown KA, Aakre ME, Gorska AE, Price JO, Eltom SE, Pietenpol JA, et al. Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast cancer research : BCR*. 2004;6(3):R215-31. Epub 2004/04/16.
280. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90. Epub 2011/02/08.
281. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108. Epub 2015/02/06.