



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΛΑΒΩΝ DNA

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Επιδιόρθωση οξειδωτικών ομαδοποιημένων βλαβών DNA ύστερα από έκθεση καρκινικών κυττάρων σε ιοντιζουσες ακτινοβολίες»*

ΖΑΧΑΡΕΝΙΑ ΝΙΚΗΤΑΚΗ

Διπλωματούχος της

ΣΧΟΛΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΕΜΠ

Επιβλέπων:

**Δρ Αλέξανδρος Γ. Γεωργακίλας,**

Αν. Καθηγητής ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ

Αθήνα, Μάρτιος 2017





ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ Κ' ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΛΑΒΩΝ DNA

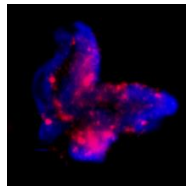
## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Επιδιόρθωση οξειδωτικών ομαδοποιημένων βλαβών DNA ύστερα από έκθεση καρκινικών κυττάρων σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες»*

**ΖΑΧΑΡΕΝΙΑ ΝΙΚΗΤΑΚΗ**

Διπλωματούχος της

ΣΧΟΛΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΕΜΠ



### ΤΡΙΜΕΛΗΣ

#### ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Α. ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ, Αν. Καθ. ΕΜΠ
2. Μ.Μακροπούλου, Καθ. ΕΜΠ
3. Γ.Τερζούδη, Ερευν.Α, ΕΚΕΦΕ  
«Δημόκριτος»

### ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ

#### ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Α. ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ, Αν. Καθ. ΕΜΠ
2. Μ.Μακροπούλου, Καθ. ΕΜΠ
3. Γ.Τερζούδη, Ερευν.Α, ΕΚΕΦΕ  
«Δημόκριτος»
4. Μ.Κόκκορης, Αν. Καθ.ΕΜΠ
5. Β.Γοργούλης, Καθ. ΕΚΠΑ
6. G.Iliakis, Prof. Universität  
Duisburg-Essen, Germany
7. L.Shiver, Prof. Technische  
Universität Wien, Vienna, Austria

Αθήνα, Μάρτιος 2017

Copyright © - All rights reserved

Ζαχαρένια Νικητάκη.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν στη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα.

.....  
Ζαχαρένια Νικητάκη

Διπλωματούχος της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

© 2017 - All rights reserved

*Στο Νικητογιώργη και στην Ελένη*



# Ευχαριστίες

Η διατριβή μου εκπονήθηκε στον Τομέα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π. από το Δεκέμβριο του 2012 έως το Μάρτιο του 2017 και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Βλαβών DNA, υπεύθυνος του οποίου καθώς και επιβλέπων της εργασίας μου είναι ο Αναπληρωτής Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου για τη σταθερή στήριξη που μου παρείχε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ο κύριος όγκος των πειραμάτων για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής εκτελέστηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Υγειοφυσικής, του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας, στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», με διευθυντή το Δρα Γαβριήλ Παντελιά και υπεύθυνη τη Δρα Γεωργία Τερζούδη, Ερευνήτρια Α', τους οποίους και ευχαριστώ θερμά που με δέχτηκαν ξανά στο εργαστήριό τους. Ευχαριστώ ιδιαίτερω τη Δρα Τερζούδη για τη σταθερή υποστήριξή της, στο πρώτο μου πτυχίο και στα χρόνια του διδακτορικού μου. Ανέλαβε ακούραστα τις ακτινοβολήσεις σχεδόν για κάθε ένα από τα πολλά πειράματα που εκτέλεσα στο εργαστήριό της. Στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, ειδικότερα στην αρχή του διδακτορικού μου είχα την τύχη να εργαστώ με τη Δρα Βασιλική Χατζή, η οποία ήταν η πρώτη σε αυτό το εργαστήριο που ξεκίνησε να αναζητά πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού με την ιστόνη γ-Η2ΑΧ. Με τη Βάσια εργαστήκαμε μαζί τους πρώτους μήνες, μου εξήγησε λεπτομερώς τις επιμέρους βιολογικές διεργασίες και με δίδαξε πλήθος τεχνικών που μου φάνηκαν πολύ χρήσιμες στη συνέχεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Την ευχαριστώ θερμά για το χρόνο που μου αφιέρωσε και για όλα τα τεχνικά που εκείνη είχε με δική της προσπάθεια προσδιορίσει και στη συνέχεια μου μετέδωσε. Κάθε φορά που αναζήτησα τη συμβουλή της πάντα είχε κάτι ουσιώδες να μου προτείνει.

Το 2014 επισκέφθηκα για δύο μήνες το Ινστιτούτο Ιατρικής Ακτινοβιολογίας, στο Έσσεν της Γερμανίας, διευθυντής του οποίου είναι ο διεθνώς αναγνωρισμένος καθηγητής Ηλιάκης Γιώργος. Τον ευχαριστώ πολύ για την ευκαιρία που μου έδωσε, καθώς η διάρκεια της παραμονής μου εκεί αποδείχθηκε επιστημονικά πολύ γόνιμη. Ευχαριστώ όλη του την ομάδα και ιδιαίτερω τον Dr Emil Mladenov και τον υποψήφιο διδάκτορα Vladimir Νίκολοβ. Ο Emil με δίδαξε τις πειραματικές τεχνικές που εκεί χρησιμοποιούν, αφιέρωσε πολύ χρόνο για τα δικά μου πειράματα και είχαμε ιδιαίτερω ενδιαφέροντες

επιστημονικές συζητήσεις. Ο Vladimir μού έδειξε τις τεχνικές μικροσκοπίας και επίσης αφιέρωσε πολύ χρόνο μαζί μου, τόσο στο μικροσκόπιο όσο και στις μπουραρίες του Έσσεν. Το 2015 επισκέφθηκα ξανά το ίδιο εργαστήριο για κάποιες συμπληρωματικές μετρήσεις. Και πάλι έτυχα θερμής υποδοχής από όλη την ομάδα και τους ευχαριστώ όλους.

Το Δρα Ιωάννη Μιχαλόπουλο, βιολόγο εξειδικευμένο στη Βιοπληροφορική θέλω να ευχαριστήσω που με εισήγαγε στις τεχνικές του ενδιαφέροντός του. Οι γνώσεις που αποκόμισα από τη συναναστροφή μαζί του ήταν ιδιαίτερος χρήσιμες και έφεραν και πολύ καλό αποτέλεσμα και σε επίπεδο δημοσιεύσεων.

Από το Molecular Radiation Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Centre της Μεμβούρνης την Dr Olga Martin που ακτινοβόλησε και μου έστειλε κύτταρα και ιδιαίτερος τον Dr Pavel Lobachevsky που μας παραχώρησε το λογισμικό καταμέτρησης των εστιών φθορισμού που ο ίδιος έχει αναπτύξει και για την προθυμία του να εξελίξει περαιτέρω αυτό το λογισμικό σύμφωνα με τις απαιτήσεις που προέκυψαν από τις δικές μας αναλύσεις.

Την PD Dr. Christine E. Hellweg από το Institute of Aerospace Medicine , Radiation Biology, Linder Hoehe, Germany και την Dr Megumi Hada από το Prairie View A&M University, Texas City ευχαριστώ για τη συνεργασία μας.

Την καθηγήτρια Μυρσίνη Μακροπούλου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την καθοδήγηση και την παρουσία της από τα φοιτητικά μου χρόνια, ευχαριστώ θερμά.

Τους καθηγητές Μιχαήλ Κόκκορη, από τη Σχολή μας, Βασίλειο Γοργούλη, από την Ιατρική Σχολή Αθηνών και τον καθηγητή Lembit Shiver από το Institute of Atomic and Subatomic Physics, Vienna University of Technology, ευχαριστώ για τη συμμετοχή τους ως μέλη της επιταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Θέλω από καρδιάς να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Τομέα Φυσικής, τους δασκάλους που είχα κατά τα φοιτητικά μου χρόνια για το καλό κλίμα συνεργασίας και ευγενούς άμιλλας που ακούραστα καλλιεργούν και εμπνέουν. Ο Τομέας Φυσικής της Σχολής μας πάντα ήταν ένα φιλόξενο περιβάλλον με δασκάλους προσιτούς και πρόθυμους να προάγουν τα ενδιαφέροντά μας αλλά και να μας στηρίζουν στις αδυναμίες μας.



## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Abstract.....	v
Πρόλογος.....	xiii
Συντομογραφίες.....	xv
Abbreviations.....	xv
<b>ΜΕΡΟΣ Α΄ - ΘΕΩΡΙΑ</b> .....	<b>1</b>
1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA.....	1
1.1 Αλληλεπίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με τη βιολογική ύλη.....	1
1.2 Παράγοντες επαγωγής βλαβών DNA.....	3
1.3 Βλάβες DNA.....	4
1.4 Σύνθετες βλάβες DNA.....	5
1.5 Θεωρητική πρόβλεψη επαγωγής βλαβών DNA.....	11
2 ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA.....	12
2.1 Μηχανισμοί απόκρισης στις βλάβες (DNA damage response-DDR).....	12
2.2 Κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης.....	13
3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA.....	31
3.1 Άμεση ανίχνευση.....	31
3.2 Έμμεση ανίχνευση.....	34
3.3 Ανίχνευση βλαβών μέσω των βιολογικών τους επιπτώσεων.....	40
<b>Β΄ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>43</b>
4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
4.1 Ανοσοφθορισμός.....	43
4.2 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας.....	46
4.3 Εκθέσεις σε ιοντιζουσες ακτινοβολίες.....	48
4.4 Απεικόνιση.....	51
4.5 Πρωτόκολλο χρώσης.....	56
4.6 Μέθοδοι εκτίμησης του συνεντοπισμού.....	56
4.7 Χρήση λογισμικού για τη συστηματική ανάλυση των εστιών φθορισμού.....	63
5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
5.1 Μετρήσεις διαστάσεων.....	76
5.2 Μελέτη δικλωνων θραύσεων.....	80
5.3 Μελέτη ΔΚΘ υπό συνθήκες ανεπάρκειας / παρεμπόδισης επιδιορθωτικών μηχανισμών DNA.....	106
5.4 Μελέτες συνεντοπισμού και σύνθετες βλάβες DNA.....	113
<b>ΜΕΡΟΣ Γ΄ – ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</b> .....	<b>127</b>
6 ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	127
6.1 Αναστολείς επιδιόρθωσης ανά μηχανισμό.....	127
6.2 Συνδυαστική Φονικότητα.....	132

6.3	Μελλοντικές κατευθύνσεις για τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης.....	143
7	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	149
7.1	Βιοδείκτες για την ανάδειξη της προέλευσης βλαβών DNA.....	149
7.2	Γονίδια φυτών ως βιοδείκτες για την ανίχνευση έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία...	157
7.3	Ανίχνευση κοινών γονιδίων βιοδεικτών βλαβών DNA σε άνθρωπο και φυτά. ....	163
8	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΦΥΤΑ .....	166
8.1	Γονίδια του <i>Homo sapiens</i> που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA.....	167
8.2	Γονίδια του <i>Arabidopsis thaliana</i> που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA .....	170
8.3	Σύγκριση των μηχανισμών επιδιόρθωσης μεταξύ των δύο οργανισμών μέσω της εξεύρεσης ορθόλογων γονιδίων.....	171
8.4	Ανάδειξη «νέων» γονιδίων για τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA .....	175
9	ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ .....	181
9.1	Φαινόμενο του παρατυχόντος - bystander effect.....	181
9.2	Συστημικά φαινόμενα.....	183
9.3	Παρεμπύπτον φαινόμενο (abscopal effect).....	184
9.4	Βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση των μηχανισμών που συναποτελούν τη μη στοχευμένη δράση ΙΑ.....	186
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	199
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	203
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	221

## Περίληψη

Στη διατριβή αυτή μελετήθηκαν οι σύνθετες οξειδωτικές βλάβες DNA, δίκλωνες θραύσεις αυξημένης πολυπλοκότητας που συνοδεύονται και από βλάβες βάσεων στην εγγύς τους περιοχή. Οι βλάβες αυτές θεωρούνται η υπογραφή των ιοντιζουσών ακτινοβολιών αλλά και του ισχυρού οξειδωτικού στρες στο κύτταρο. Αποτελούνται από διάφορες βλάβες, όπως δίκλωνες θραύσεις, μονόκλωνες και αλλοιώσεις βάσεων πολύ κοντά η μία στην άλλη εντός 10-15 ζευγών βάσεων DNA. Λόγω της μεγάλης δυσκολίας επιδιόρθωσής τους μπορούν να οδηγήσουν πολύ εύκολα σε μεταλλάξεις, γονιδιωματική αστάθεια και καρκινογένεση. Επιπλέον, στη διεθνή βιβλιογραφία είναι γενικά αποδεκτό ότι υπάρχει μεγάλη δυσκολία να ανιχνευθούν σε επίπεδο κυττάρου *in situ*.

Η μέθοδος που κύρια ακολουθήθηκε είναι ο *in situ* έμμεσος ανοσοφθορισμός σε πειραματικό επίπεδο με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των διάφορων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των επιμέρους βλαβών π.χ. δίκλωνων ( $\gamma$ -H2AX), οξειδωτικών (OGG1) κτλ. Επίσης έγινε μετα-ανάλυση παλαιότερων πειραματικών δεδομένων, κάνοντας εφικτή τη συστηματική θεώρηση των φαινομένων με εργαλεία Βιοπληροφορικής. Το ενδιαφέρον για τις βλάβες στο DNA αλλά και την απόκριση του κυττάρου σε αυτές προκύπτει από τη διττή δράση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Αφενός, η τυχαία έκθεση σε ιοντιζουσες ακτινοβολίες μπορεί να διαταράξει την ακεραιότητα του DNA και του γονιδιώματος, προκαλώντας μεταλλάξεις, οι οποίες είτε είναι χρήσιμες, προάγοντας την εξελικτική διαδικασία, είτε είναι επιζήμιες προκαλώντας γονιδιωματική αστάθεια και πιθανά καρκίνο. Αφετέρου, μία από τις σημαντικότερες θεραπείες ενάντια στον καρκίνο, η ακτινοθεραπεία, χρησιμοποιεί τις ιοντιζουσες ακτινοβολίες για να στοχεύσει στο DNA των καρκινικών κυττάρων και να προκαλέσει την ελεγχόμενη θανάτωσή τους.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μελετήθηκαν διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές προερχόμενες από καρκίνο του μαστού (MCF7), ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HepG2), καρκίνωμα του πνεύμονα (A549), γλοιοβλάστωμα (MO59K και τα ισογονιδιακά τους MO59J), αλλά και φυσιολογικά αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα (FEP18-11-T1), καθώς και λεμφοκύτταρα υγιών δοτών. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά είδη ιοντιζουσας ακτινοβολίας, ηλεκτρομαγνητική (ακτίνες  $\gamma$  και  $X$ ), αλλά και φορτισμένα σωματίδια (σωμάτια  $\alpha$  και ιόντα Αργού). Παρατηρήθηκε αύξηση της πολυπλοκότητας των βλαβών με την αύξηση της γραμμικής μεταφοράς ενέργειας της προσπίπτουσας

ακτινοβολίας, αλλά και καθυστέρηση στην επιδιόρθωση των βλαβών. Δοκιμάστηκε επίσης χημική αναστολή της επιδιορθωτικής πρωτεΐνης (κινάσης) DNA-PK με δύο διαφορετικούς αναστολείς, τους NU7026 και NU7441. Διαπιστώθηκε ότι ο NU7441 προκαλεί ισχυρότερη παρεμπόδιση της επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων έναντι του NU7026. Επίσης η DNA-PK ελέγχθηκε και με τη χρήση ζεύγους κυτταρικών σειρών, τα MO59K και MO59J, όπου τα δεύτερα είναι ανεπαρκή στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της πρωτεΐνης DNA-PK. Η επιδιόρθωση φάνηκε ότι καθυστερεί μεν, αλλά εν τέλει συντελείται. Για την ανίχνευση των σύνθετων βλαβών που περιλαμβάνουν και οξειδωτικές βλάβες βάσεων στην περιοχή της δίκλωνης θραύσης DNA προσδιορίστηκε μετά από αλληπάλληλες δοκιμές το κατάλληλο πρωτόκολλο που κάνει εφικτή την οπτικοποίησή τους, ως συνεντοπισμένο σήμα φθορισμού προερχόμενο από τα φθορίζοντα αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων ( $\gamma$ -H2AX ή 53BP1) και τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των βλαβών βάσεων (OGG1 ή APE1).

Για την εκτίμηση του συνεντοπισμού σε εικόνες φθορισμού, προτείνεται ως αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ένα κριτήριο-παράμετρος, το οποίο ονομάσαμε  $P_{cle}$ , το οποίο διατηρεί την τοπολογία των εστιών φθορισμού για τις δίκλωνες θραύσεις, που είναι και το κέντρο της επιδιόρθωσης, αλλά για τις οξειδωτικές βλάβες βάσεων λαμβάνει υπόψη τη μέση φωτεινότητά τους. Η παράμετρος  $P_{cle}$  συγκρίνει την επιφανειακή (χωρική) φωτεινότητα του σήματος από την επισημασμένη πρωτεΐνη επιδιόρθωσης των βλαβών βάσεων ορισμένη στις εστίες φθορισμού των δίκλωνων θραύσεων με το ίδιο μέγεθος ορισμένο στον υπόλοιπο πυρήνα του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται κανονικοποίηση των όποιων διαφορών μεταξύ των πειραμάτων και παράγονται συγκρίσιμα αποτελέσματα. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της θεώρησης είναι ότι αποφαινεται άμεσα για το αν ο εμφανιζόμενος συνεντοπισμός είναι τυχαίος ή βιολογικά σημαντικός, αν η τιμή είναι γύρω στο 1 ή μεγαλύτερη από το 1 αντίστοιχα.

Προσεγγίζοντας το πρόβλημα της επιδιόρθωσης των σύνθετων βλαβών DNA σε επίπεδο οργανισμού και βιολογίας συστημάτων (systems biology), εκτελέστηκε και ανάλυση των παγκόσμιων βιβλιογραφικών δεδομένων με εργαλεία βιοπληροφορικής. Έγινε χρήση πλήθους διαφορετικών εργαλείων ελεύθερου λογισμικού και πολλαπλός συστηματικός έλεγχος των αποτελεσμάτων από αναγνωρισμένες βάσεις δεδομένων. Κατά περίπτωση δόθηκε προσοχή στην κατάλληλη ονοματολογία των γονιδίων, ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε ερωτήματος. Κύριο άξονα αναζήτησης αποτέλεσαν οι όροι γονιδιακής οντολογίας, ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση χαρακτηρίζεται πρωτογενής, καθώς αναζητήθηκαν δεδομένα που είναι πειραματικώς

επιβεβαιωμένα και όχι μέσω άλλων κριτηρίων (όπως τη γειννίαση στο χρωμόσωμα ή τη συνέκφραση).

Από τη βιοπληροφορική ανάλυση προέκυψε πλήθος γονιδίων για τον άνθρωπο αλλά και για τα φυτά τα οποία προτείνονται ως πιθανά να συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA ύστερα από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία ιδιαίτερα των σύνθετων βλαβών. Προσδιορίστηκαν επίσης γονίδια που προτείνονται ως βιοδείκτες για την ανίχνευση στα διάφορα είδη ενδογενούς (αντιγραφής DNA, οξειδωτικού) και εξωγενούς στρες (ιοντίζουσα ακτινοβολία) αλλά και γονίδια κατάλληλα για βιολογική δοσομετρία.

Σχετικά με την ακτινοθεραπεία του καρκίνου, μελετήθηκε η συμμετοχή των γονιδίων επιδιόρθωσης και προσδιορίστηκαν γονίδια τα οποία προτείνονται ως πιθανοί στόχοι χημικής/φαρμακευτικής αναστολής για την ενίσχυση της ακτινοθεραπείας στα πλαίσια της Συνδυαστικής Φονικότητας και προτάθηκε η ιδέα της Πολλαπλής Φονικότητας.

Τέλος μελετήθηκε η μη-στοχευμένη δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, δηλαδή οι αποκρίσεις που συμβαίνουν σε όλη την έκταση του οργανισμού που δέχεται την ακτινοβολήση, καθώς και η συμμετοχή των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA σε αυτά τα φαινόμενα.

Συνολικά τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής, σχετίζονται με την επαγωγή και επιδιόρθωση των σύνθετων βλαβών DNA και οδήγησαν στη ανάπτυξη πρωτοκόλλων για την ανίχνευση των βλαβών αυτών σε επίπεδο κυττάρου *in situ* με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Η σημασία των αποτελεσμάτων κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική και ως προς την τεχνική πρόοδο που επετεύχθη για την καλύτερευση των μεθόδων ανίχνευσης των σύνθετων βλαβών που επάγονται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, αλλά και την πληροφορία για τη δυσκολία επιδιόρθωσης, κάτι που έχει και μεγάλη βιολογική σημασία.



## Abstract

### *Repair of oxidatively-induced clustered DNA lesions, after exposure of human cancer cells to ionizing radiation.*

In the present thesis, the induction and repair of complex DNA lesions, double strand breaks (DSBs) of high complexity accompanied by oxidatively-induced base lesions in their close vicinity were studied after exposure to ionizing radiation (IR) of varying quality i.e. linear energy transfer (LET). These lesions are considered the hallmark of ionizing radiation as well as of the high levels of oxidative stress. Complex DNA damage may be consisted by DSBs, single strand breaks (SSBs) and base lesions within a very short DNA fragment up to 10-15 base pairs. Clustered DNA damage challenges the cell DNA repair machinery and therefore the eventual misrepair could lead to mutations, genomic instability or even carcinogenesis. The *in situ* immunofluorescence-based detection of this kind of damage is generally accepted as a very challenging goal and can be performed currently only at the chromosomal level and within DNA regions much larger than the above mentioned above.

The main experimental method followed in this thesis, it is the *in situ* indirect immunofluorescence, using specific antibodies against several human DNA repair proteins i.e. for DSBs ( $\gamma$ -H2AX), for oxidative base lesions (OGG1) and for abasic DNA sites (hAPE1). Moreover complementary meta-analysis of experimental results was performed, achieving the systematical review of underlying mechanisms. The scientific interest for DNA damage as well as for the consequential cellular response can be attributed to the dual action of ionizing radiation. On one hand, coincidental exposure to ionizing radiation could disrupt DNA integrity, causing mutations, sometimes beneficial, promoting evolution or detrimental causing genomic instability and sometimes cancer. On the other hand, one of the most important therapies against cancer, radiotherapy utilizes ionizing radiation to target the DNA of tumor cells and thus to induce programmed cell death (apoptosis).

In the framework of the present thesis, several human cancer cell lines originating from breast cancer (MCF7), hepatocellular carcinoma (HepG2), lung carcinoma (A549), glioblastoma (MO59K and their isogenic MO59J) but also normal immortalized keratinocytes (FEP18-11-T1), as well as lymphocytes from healthy donors were studied. Different types of ionizing radiation and LET, electromagnetic (Low LET:  $\gamma$ - and X- rays) and charged particles (high-LET:  $\alpha$ - particles and Argon ions) were used. Increasing

complexity of the induced damage was detected with the increase of LET of the incident radiation. Regarding the repair of this damage, a significant delay in the process of complex lesions was also observed. Chemical inhibition of the DNA repair protein DNA-PK was induced in cell cultures, using two different and highly specific inhibitors, namely the NU7026 and the NU7441. NU7441 was found to induce stronger inhibition in double strand break repair process than NU7026. DNA-PK was also tested by using a pair of cell lines (MO59K and MO59J), MO59J are DNA-PKcs deficient. DNA repair was delayed but finally was achieved.

In order to detect complex DNA lesions that also include oxidative base lesions in the vicinity of a DSB, we defined the proper protocol which allows their visualization as colocalized fluorescence signal coming from fluorescent antibodies that target the DSB repair proteins ( $\gamma$ -H2AX or 53BP1) and the base lesion repair proteins (OGG1 or APE1).

In order to evaluate the colocalization levels based on “fluorescent” images, as a result of the present work, we introduced a criterion-Parameter called  $P_{clc}$  (colocalization parameter). Our criterion conserves the focus topology for the DSBs, which are considered the ‘centers’ of repair, and regarding the oxidative base lesions, it uses their mean luminosity.  $P_{clc}$  compares the surface (or spatial in the case of 3D images) luminosity of the signal coming from the labeled antibody that targets the base repair enzymes, considered over the DSB foci area with the same value considered over the rest of the cell nucleus area. Using our suggested parameter  $P_{clc}$ , normalization of any fluctuation among images has been achieved, making possible the comparison among images resulting by different experiments. The main advantage of this consideration is that it allows unbiased the decision whether or not the occurring colocalization is random or of biological importance. Significant  $P_{clc}$  increases were detected with increasing LET and this trend was verified with some minor variations for all radiations used. In addition, specific correlations were made with repair time and focus size synonymous with damage complexity.

Approaching the DNA repair of complex DNA lesions on organism level (systems biology), data analysis coming from universal data bases was performed, utilizing bioinformatics. For this purpose several open source tools were utilized, and multilevel systematic proofing of the results was performed. Proper gene nomenclatures were case - specifically used. Gene ontology terms hold the key role in the gene screening that was performed, making the results reliable. This analysis has been based exclusively on experimentally evaluated data. Specific correlations were done between DNA damage response (DDR) and repair genes with the immune system and inflammatory response



especially in the case of radiation-induced systemic effects which consisted a significant part of our bioinformatical work. The idea of radiation non-targeted effects holds currently a prominent position in radiation biology and our main hypothesis has been that complex DNA lesions and their repair can be regarded as the first 'danger' signal due to the difficulty the cell encounters in processing and amending these genome problems.

Bioinformatics analysis revealed numerous (human and plant) genes that we believe that are also participating in DNA repair machinery, following the exposure to IR and especially to the repair of clustered DNA lesions. Several other genes were identified and are proposed as potential biomarkers of exposure to endogenous (replication, oxidative) and to exogenous stress (ionizing radiation), being also applicable to biological dosimetry. Regarding cancer therapy, the role of DNA repair genes was explored and several genes were suggested as potential targets for chemical/pharmaceutical inhibition in order to enhance radiotherapy in the frame of Synthetic Lethality, moreover the idea of Multipathway Lethality was also proposed.

**Summarizing**, the results of this study are centered on the biophysical mechanisms induction and repair of complex DNA lesions. They led to the development of protocols for the detection of these lesions on the cellular level, by using *in situ* immunofluorescence. The scientific importance of these findings relies primarily on two aspects: **1.** the technical improvements and advancement of the field of *in situ* detection of complex damage as well as **2.** the biophysical/biological importance of the findings on the processing of complex DNA damage consisting of a DSB and neighboring oxidative lesions challenging the repair machinery of the cell. More importantly, the biophysical experimental and complementary bioinformatics work has been published in the following papers:

[1] Z. Nikitaki, V. Nikolov, I. V. Mavragani, I. Plante, D. Emfietzoglou, G. Iliakis, and Alexandros G. Georgakilas, "Non-DSB clustered DNA lesions. Does theory colocalize with the experiment?," *Radiation Physics and Chemistry*, 2016. 128: p. 26-35.

### **Abstract**

Ionizing radiation results in various kinds of DNA lesions such as double strand breaks (DSBs) and other non-DSB base lesions. These lesions may be formed in close proximity (ie, within a few nanometers) resulting in clustered types of DNA lesions. These damage clusters are considered the signature of ionizing radiation, notably charged particles of high linear energy transfer (LET). Accumulating theoretical and experimental evidence suggest the induction of these clustered lesions appears under various irradiation conditions but also as a result of high levels of oxidative stress. The biological significance

of these clustered DNA lesions pertains to the inability of cells to process them efficiently as isolated lesions. The results in the case of unsuccessful or erroneous repair can vary from mutations up to chromosomal instability. In this mini review, we discuss of several Monte Carlo simulation codes and experimental evidence regarding the induction and repair of radiation-induced non-DSB complex DNA lesions. We also critically discuss the most widely used methodologies (ie, gel electrophoresis and fluorescence microscopy [in situ colocalization assays]). Based on the comparison of different approaches, we present examples and suggestions for the improved detection of these lesions in situ. Based on the current status of knowledge, we conclude that there is a great need for improvement of the detection techniques at the cellular or tissue level, which will provide valuable information for understanding the mechanisms used by the cell to process clustered DNA lesions.

[2] Z. Nikitaki, V. Nikolov, I. V. Mavragani, E. Mladenov, A. Mangelis, D. A. Laskaratou, Georgios I. Fragkoulis, Christine E. Hellweg, Olga A. Martin, Dimitris Emfietzoglou, Vasiliki I. Hatzi, Georgia I. Terzoudi, George Iliakis and Alexandros G. Georgakilas, "*Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET)*," *Free Radic Res*, pp. 1-45, Sep 5 2016.

### **Abstract**

Detrimental effects of ionizing radiation (IR) are correlated to the varying efficiency of IR to induce complex DNA damage. A double strand break (DSB) can be considered the simpler form of complex DNA damage. These types of damage can consist of double strand breaks (DSBs), single strand breaks (SSBs) and/or non-DSB lesions such as base damages and apurinic/aprimidinic (AP; abasic) sites in different combinations. Enthralling theoretical (Monte Carlo simulations) and experimental evidence suggests an increase of the complexity of DNA damage and therefore repair resistance with linear energy transfer (LET). In this study, we have measured the induction and processing of DSB and non-DSB oxidative clusters using adaptations of immunofluorescence. Specifically, we applied foci colocalization approaches as the most current methodologies for the *in situ* detection of clustered DNA lesions in a variety of human normal (FEP18-11-T1) and cancerous cell lines of varying repair efficiency (MCF7, HepG2, A549, MO59K/J) and radiation qualities of increasing linear energy transfer (LET) i.e.,  $\gamma$ -, X-rays 0.3-1 keV/ $\mu$ m,  $\alpha$ -particles 116 keV/ $\mu$ m and  $^{36}\text{Ar}$  ions 270 keV/ $\mu$ m. Using  $\gamma$ -H2AX or 53BP1 foci staining as DSB probes, we calculated a DSB apparent rate of 5-16 DSBs/cell/Gy decreasing with LET. A similar trend was measured for non-DSB oxidized base lesions detected using antibodies against the human repair enzymes 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) or AP endonuclease (APE1) i.e. damage foci as probes for oxidized purines or abasic sites respectively. In addition, using colocalization parameters previously introduced by our groups, we detected an increasing clustering of damage for DSBs and non-DSBs. We also made correlations of damage complexity with the repair

efficiency of each cell line and we discuss the biological importance of these new findings with regard to the severity of IR due to the complex nature of its DNA damage.

[3] Z. Nikitaki, I. V. Mavragani, D. A. Laskaratou, V. Gika, V. P. Moskvina, K. Theofilatos Konstantinos Vougas, Robert D. Stewart and Alexandros G. Georgakilas., "Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players," *Semin Cancer Biol*, vol. 37-38, pp. 77-95, Jun 2016.

### **Abstract**

Exposure of cells to any form of ionizing radiation (IR) is expected to induce a variety of DNA lesions, including double strand breaks (DSBs), single strand breaks (SSBs) and oxidation, as well as loss of bases, i.e. abasic sites. The damaging potential of IR is primarily related to the generation of electrons, which through their interaction with water produce free radicals. In their turn, free radicals attack DNA, proteins and lipids. Damage is induced also through direct deposition of energy. These types of IR interactions with biological materials are collectively called 'targeted effects', since they refer only to the irradiated cells. Earlier and sometimes 'anecdotal' findings were pointing to the possibility of IR actions unrelated to the irradiated cells or area, i.e. a type of systemic response with unknown mechanistic basis. Over the last years, significant experimental evidence has accumulated, showing a variety of radiation effects for 'out-of-field' areas (non-targeted effects-NTE). The NTE involve the release of chemical and biological mediators from the 'in-field' area and thus the communication of the radiation insult via the so called 'danger' signals. The NTE can be separated in two major groups: bystander and distant (systemic). In this review, we have collected a detailed list of proteins implicated in either bystander or systemic effects, including the clinically relevant abscopal phenomenon, using improved text-mining and bioinformatics tools from the literature. We have identified which of these genes belong to the DNA damage response and repair pathway (DDR/R) and made protein-protein interaction (PPI) networks. Our analysis supports that the apoptosis, TLR-like or NOD-like receptor signaling pathways are the main pathways participating in NTE. Based on this analysis, we formulate a biophysical hypothesis for the regulation of NTE, based on DNA damage and apoptosis gradients between the irradiation point and various distances corresponding to bystander (5 mm) or distant effects (5 cm). Last but not least, in order to provide a more realistic support for our model, we calculate the expected DSB and non-DSB clusters along the central axis of a representative 200.6 MeV pencil beam calculated using Monte Carlo DNA damage simulation software (MCDS) based on the actual beam energy-to-depth curves used in therapy.

[4] A. G. Georgakilas, A. Pavlopoulou, M. Louka, Z. Nikitaki, C. E. Vorgias, P. G. Bagos, Ioannis Michalopoulos, "Emerging molecular networks common in ionizing radiation, immune and inflammatory responses by employing bioinformatics approaches," *Cancer Lett*, vol. 368, pp. 164-72, Nov 28 2015.

**Abstract**

Efficient radiation therapy is characterized by enhanced tumor cell killing involving the activation of the immune system (tumor immunogenicity) but at the same time minimizing chronic inflammation and radiation adverse effects in healthy tissue. The aim of this study was to identify gene products involved in immune and inflammatory responses upon exposure to ionizing radiation by using various bioinformatic tools. Ionizing radiation is known to elicit different effects at the level of cells and organism i.e. DNA Damage Response (DDR), DNA repair, apoptosis and, most importantly, systemic effects through the instigation of inflammatory 'danger' signals and innate immune response activation. Genes implicated both in radiation and immune/inflammatory responses were collected manually from the scientific literature with a combination of relevant keywords. The experimentally validated and literature-based results were inspected, and genes involved in radiation, immune and inflammatory response were pooled. This kind of analysis was performed for the first time, for both healthy and tumor tissues. In this way, a set of 24 genes common in all three different phenomena was identified. These genes were found to form a highly connected network. Useful conclusions are drawn regarding the potential application of these genes as markers of response to radiation for both healthy and tumor tissues through the modulation of immune and/or inflammatory mechanisms.

[5] N. Hekim, Z. Cetin, Z. Nikitaki, A. Cort, and E. I. Saygili, "Radiation triggering immune response and inflammation," *Cancer Lett*, vol. 368, pp. 156-63, Nov 28 2015.

**Abstract**

Radiation therapy (RT) is a well-established but still under optimization branch of Cancer Therapy (CT). RT uses electromagnetic waves or charged particles in order to kill malignant cells, by accumulating the energy onto these cells. The issue at stake for RT, as well as for any other Cancer Therapy technique, is always to kill only cancer cells, without affecting the surrounding healthy ones. This perspective of CT is usually described under the terms "specificity" and "selectivity". Specificity and selectivity are the ideal goal, but the ideal is never entirely achieved. Thus, in addition to killing healthy cells, changes and effects are observed in the immune system after irradiation. In this review, we mainly focus on the effects of ionizing radiation on the immune system and its components like bone marrow. Additionally, we are interested in the effects and benefits of low-dose ionizing radiation on the hematopoiesis and immune response. Low dose radiation has been shown to induce biological responses like inflammatory responses, innate immune system activation and DNA repair (adaptive response). This review reveals the fact that

there are many unanswered questions regarding the role of radiation as either an immuneactivating (low dose) or immunosuppressive (high dose) agent.

[6] Z. Nikitaki, I. Michalopoulos, and A. G. Georgakilas, "*Molecular inhibitors of DNA repair: searching for the ultimate tumor killing weapon*," *Future Med Chem*, vol. 7, pp. 1543-58, Aug 2015.

#### **Abstract**

DNA repair (DR) inhibitors are small molecules that interact with DR proteins in order to disrupt their function and induce a 'strike' to the high fidelity of the mammalian DNA repair systems. Many anticancer therapies aim to harm the DNA of the usually highly proliferative cancer cell, causing it to undergo apoptosis. In response to this, cancer cells attempt to fix the induced lesion and reconstitute its genomic integrity, in turn reducing the efficacy of treatment. To overcome this, DR inhibitors suppress DNA repair proteins' function, increasing the potency and tumor killing effect of chemotherapy or radiotherapy. In this review, we discuss clinically applied novel inhibitors under translational investigation and we apply bioinformatic tools in order to identify repair proteins implicated in more than two phenomenically distinct DNA repair pathways (e.g., base excision repair and nonhomologous end joining), that is, the concept of 'synthetic lethality'. Our study can aid towards the optimization of this therapeutic strategy and, therefore, maximizing treatment effectiveness like in the case of radiation therapy.

[7] Z. Nikitaki, C. E. Hellweg, A. G. Georgakilas, and J. L. Ravanat, "Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations," *Front Chem*, vol. 3, p. 35, 2015.

#### **Abstract**

A variety of environmental stresses like chemicals, UV and ionizing radiation and organism's endogenous processes such as replication stress and metabolism can lead to the generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) that can attack cellular vital components like DNA, proteins and lipid membranes. Among them, much attention has been focused on DNA since DNA damage plays a role in several biological disorders and aging processes. Thus, DNA damage can be used as a biomarker in a reliable and accurate way to quantify for example radiation exposure and can indicate its possible long term effects and cancer risk. Based on the type of DNA lesions detected one can hypothesize on the most probable mechanisms involved in the formation of these lesions for example in the case of UV and ionizing radiation (e.g., X- or  $\alpha$ - $\gamma$ -rays, energetic ions, neutrons). In this review we describe the most accepted chemical pathways for DNA damage induction and the different types of DNA lesions, i.e., single, complex DNA lesions etc. that can be used as DNA damage biomarkers. We critically compare DNA damage detection methods and their limitations. In addition, we suggest the use of DNA repair gene products as biomarkers for identification of different types of stresses i.e., radiation, oxidative, or replication stress, based on bioinformatic approaches and meta-analysis of literature data.

[8] V. I. Hatzi, D. A. Laskaritou, I. V. Mavragani, Z. Nikitaki, A. Mangelis, M. I. Panayiotidis, et al., "*Non-targeted radiation effects in vivo: a critical glance of the future in radiobiology*," *Cancer Lett*, vol. 356, pp. 34-42, Jan 1 2015.

**Abstract**

Radiation-induced bystander effects (RIBE), demonstrate the induction of biological non-targeted effects in cells which have not directly hit by radiation or by free radicals produced by ionization events. Although RIBE have been demonstrated using a variety of biological endpoints the mechanism(s) of this phenomenon still remain unclear. The controversial results of the *in vitro* RIBE and the evidence of nontargeted effects in various *in vivo* systems are discussed. The experimental evidence on RIBE, indicate that a more analytical and mechanistic in depth approach is needed to secure an answer to one of the most intriguing questions in radiobiology.

## Πρόλογος

Η αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας (ΙΑ) με τη βιολογική ύλη είναι ένα φαινόμενο που η πλήρης αποσαφήνισή του βοηθά τόσο στην κατανόηση της πρόκλησης νεοπλασίας όσο και στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου. Τούτο συμβαίνει διότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία αφενός αποτελεί γενεσιουργό αιτία του καρκίνου καθώς προκαλεί σύνθετες (πολύπλοκες) βλάβες DNA, μεταλλάξεις και γονιδιωματική αστάθεια και αφετέρου είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο στην καταπολέμησή του, μέσω της ακτινοθεραπείας. Οι βλάβες που προκαλούνται στο DNA των κυττάρων λόγω της ιοντίζουσας ακτινοβολίας έχουν το ειδοποιό χαρακτηριστικό ότι εμφανίζονται πυκνές και ομαδοποιημένες (clustered DNA damage) σε αντίθεση για παράδειγμα με τις ενδογενείς χημικές βλάβες οι οποίες εμφανίζονται διάσπαρτες. Ως «ομαδοποιημένες» ορίζονται οι βλάβες εκείνες όταν επισυμβαίνουν δύο ή περισσότερες εντός ενός τμήματος DNA που δεν υπερβαίνει τα δέκα ζεύγη βάσεων (bp-base pairs) σε μήκος.

## Σκοπός της διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της επαγωγής και της επιδιόρθωσης των σύνθετων βλαβών DNA που έχουν προκληθεί από ιοντίζουσα ακτινοβολία σε ανθρώπινα καρκινικά και υγιή κύτταρα. Για το σκοπό αυτό χρειάστηκαν αλληπάλλληλα πειράματα έως ότου να προτυποποιηθεί το κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο, αλλά και η επεξεργασία των εικόνων μικροσκοπίου.

Κατά δεύτερο λόγο, στους σκοπούς της διατριβής ήταν η συστηματική ανάλυση (μετα-ανάλυση) προγενέστερων πειραματικών δεδομένων που αφορούν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA σε ανθρώπινα κύτταρα με στόχο των προσδιορισμό βιοδεικτών βλάβης DNA, την εξεύρεση αναστολέων επιδιόρθωσης DNA, τη σύγκριση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA του ανθρώπου με των φυτών και τη μελέτη των συστημικών φαινομένων που προκαλεί η έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

### Πειραματική προσέγγιση (*in situ* ανοσοφθορισμός)

Για τη μελέτη των ομαδοποιημένων βλαβών στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μέθοδος που κυρίως εφαρμόζεται είναι ο *in situ* έμμεσος ανοσοφθορισμός. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στα αντισώματα, πρωτεΐνες κατασκευασμένες από εταιρίες με την ιδιότητα να προσδένονται επιλεκτικά σε άλλες –τις προς ανίχνευση- πρωτεΐνες. Η μέθοδος λέγεται «έμμεσος» για δύο λόγους: αφενός γιατί απαιτείται και ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο θα αναγνωρίζει ως αντιγόνο το πρώτο αντίσωμα και

ταυτοχρόνως φέρει μια φθορίζουσα χρωστική, με αποτέλεσμα, όταν το δείγμα εξεταστεί σε μικροσκόπιο φθορισμού, το δεύτερο αντίσωμα να φθορίζει, κάνοντας έτσι εμμέσως ορατή την προς ανίχνευση πρωτεΐνη και αφετέρου διότι οι προς ανίχνευση πρωτεΐνες, είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και όχι οι βλάβες αφεαυτές, οπτικοποιώντας και πάλι εμμέσως τις βλάβες, μέσω των ενζύμων επιδιόρθωσης.

Η παρούσα διατριβή εστιάζει στις σύνθετες βλάβες που περιέχουν τουλάχιστον μία διπλή (δίκλωνη) θραύση (DSB-double strand break) και κάποιες οξειδωτικές βλάβες βάσεων στην ευρύτερη 'γειτονιά' της DSB. Για τις δίκλωνες θραύσεις επιλέγονται ως δείκτες - εναλλακτικά ή και σε συνδυασμό- είτε η ιστόνη H2AX στη φωσφορυλιωμένη της μορφή ( $\gamma$ -H2AX) είτε η 53BP1 (p53 bounding protein 1). Για τις οξειδωτικές βλάβες βάσεων δοκιμάζονται οι πρωτεΐνες APE1, OGG1 και XRCC1. Έγιναν πολλά πειράματα σε 1) λεμφοκύτταρα υγιών δοτών και πλήθος άλλων πειραμάτων στις εξής ανθρώπινες κυτταρικές σειρές: 2) MCF7: καρκίνος του μαστού, 3) HepG2: ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, 4) FA549: επιθηλιακό καρκίνωμα πνεύμονα, 5-6) MO59K/MO59J: κακοήθες γλοιοβλάστωμα, 7) FEP18-11-T1: αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα, καθώς και σε 8) CHO: επιθηλιακά κύτταρα ωθήκης από Chinese hamster. Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με ιοντίζουσες ακτινοβολίες οι οποίες παρατίθενται κατά αυξανόμενη LET (γραμμική εναπόθεση ενέργειας): 1) ακτίνες  $\gamma$  LET=0.3 keV/ $\mu$ m προερχόμενες από πηγή  $^{60}\text{Co}$  GammaCell 220 irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada) ή από πηγή  $^{137}\text{Cs}$  (GammaCell40 Irradiator, Nordion International, Ottawa, ON, Canada), 2) ακτίνες  $X$  προερχόμενες από Gulmay X-ray source RS225 (X-Strahl, Surrey, UK) ή από Seifert-Pantak X-ray machine μέσης LET 2 keV/ $\mu$ m, 3) σωμάτια  $\alpha$  μέσης LET=116 keV/ $\mu$ m, 4) ιόντα  $^{36}\text{Ar}$  που επιταχύνθηκαν στον Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL, Caen, France) μέσης LET~270 keV/ $\mu$ m. Η απεικόνιση έγινε είτε με απλό μικροσκόπιο φθορισμού (ανάκλαση) είτε με συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα λογισμικά για τις εικόνες ήταν αντιστοίχως το Isis της Metasystems και το LAS X της Leica. Η ανάλυση έγινε για το μεν μικροσκόπιο επιφθορισμού με τα λογισμικά Jcount, Jquant, που ανέπτυξε ο συνεργάτης του εργαστηρίου καθηγητής Pavel Lobachevsky, ενώ για τις εικόνες από το συνεστιακό με το λογισμικό Imaris της Bitplane.

### **Βιοπληροφορική Ανάλυση (*in silico*)**

Κατά την εκπόνηση της διατριβής εκτός από τα πειράματα ανοσοφθορισμού, έγινε και σπουδαία δουλειά σε επίπεδο βιοπληροφορικής. Έγινε χρήση πλήθους εργαλείων και βάσεων δεδομένων όπως ενδεικτικά: AmiGO2, OrthoMCL-DB, BioMart-Ensembl,



Ensembl Plants, Bio-Venn, REPAIRtoire, GLAD4U, QuickGO, Gene Cards, Cancer Gene list, STRING v9 και άλλα.

## Συντομογραφίες

EA	επιδιόρθωση αναντιστοιχίας
ΔΚΘ	δίκλωνη θραύση (DNA)
IA	ιοντίζουσα ακτινοβολία
MEB	Μηχανισμός Εκτομής Βάσης
MEN	Μηχανισμός Εκτομής Νουκλεοτιδίων
ΜΚΘ	μονόκλωνη θραύση
ΜΟΕΑ	Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων
ΟΑ	Ομόλογος Ανασυνδυασμός
ΟΓΟ	όροι γονιδιακής οντολογίας

## Abbreviations

<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BER	Base excision repair
DDR	DNA damage repair
DDR/R	DNA damage repair or response
DSB	double strand break
GO	gene ontology
HR	Homologous recombination
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
MMR	MisMatch repair
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non homologous End Joining



# ΜΕΡΟΣ Α΄ - ΘΕΩΡΙΑ

## 1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA

### 1.1 Αλληλεπίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με τη βιολογική ύλη

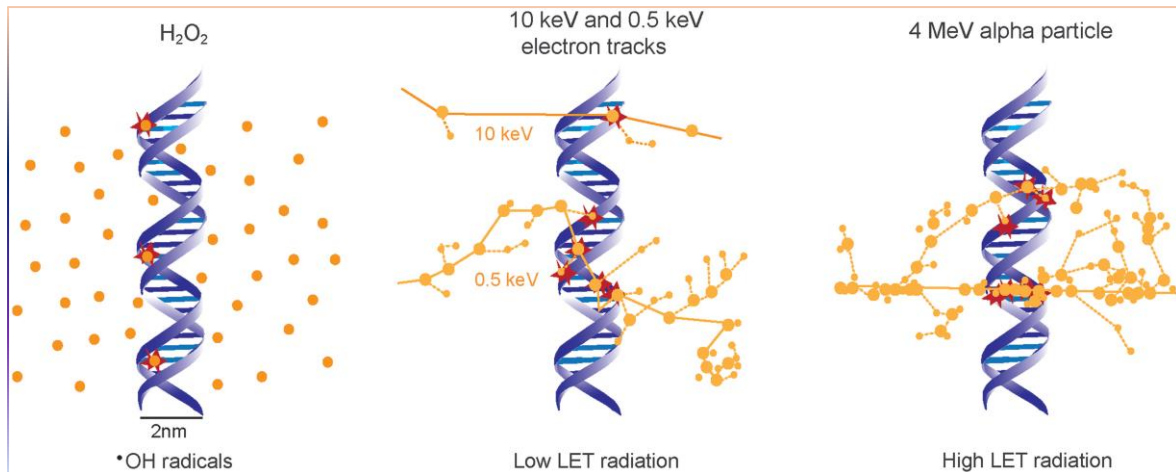
#### Βιολογική ύλη

Με τον όρο βιολογική ύλη στην παρούσα διατριβή αποκαλούνται τα κύτταρα, καθότι αποτελούν τη δομική και λειτουργική μονάδα της βιολογικής δραστηριότητας των οργανισμών. Επιπλέον για το λόγο ότι όλα τα *in situ* πειράματα που περιγράφονται έγιναν σε κυτταρικό επίπεδο. Τα κύτταρα διαφέρουν, ανάλογα με το είδος του οργανισμού και τη λειτουργία την οποία επιτελούν. Στο εξής, όπου δε διευκρινίζεται σαφώς, και γίνεται αναφορά σε κύτταρα, θα εννοούμε ένα «τυπικό» κύτταρο, το οποίο είναι νοητικό κατασκεύασμα και περιγράφει τις γενικές ιδιότητες των κυττάρων των θηλαστικών.

#### Γραμμική μεταφορά ενέργειας-LET

Ένα σωματίο ή ένα φωτόνιο δημιουργεί ιόντα στο πέρασμά του μέσα από την ύλη καθώς χάνει ενέργεια, ώστε τελικά να απορροφηθεί πλήρως, είτε παγιδευόμενο (λ.χ. ηλεκτρόνιο), είτε μεταβιβάζοντας όλη του την ενέργεια (λ.χ. φωτόνιο). Η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της διαδικασίας αυτής λέγεται γραμμική μεταβίβαση ενέργειας (linear energy transfer-LET) και μετράται σε keV απώλεια ενέργειας ανά μm μήκους της τροχιάς του σωματίου ή του φωτονίου.

Η LET προσπίπτοντος φορτισμένου σωματιδίου είναι ανάλογη του τετραγώνου του φορτίου του και αντιστρόφως ανάλογη της κινητικής ενέργειας του σωματιδίου. Επιπλέον αποτελεί το γινόμενο του ειδικού ιοντισμού, δηλαδή ο αριθμός ζευγαριών ιόντων ανά μm τροχιάς του σωματίου ή του φωτονίου και της μέσης ενέργειας που πρέπει να εναποθεθεί στην ύλη για να παραχθεί ένα ζεύγος ιόντων. Η LET ουσιαστικά περιγράφει την πυκνότητα εναπόθεσης ενέργειας από την ακτινοβολία στην ύλη και καθορίζει, σε σημαντικό βαθμό, τις συνέπειες που θα υποστεί το βιολογικό υλικό. Αναφορικά, μεγάλη LET έχουν τα βαριά φορτισμένα σωματίδια τα οποία προξενούν πιο πυκνές βλάβες στους ιστούς από όσο οι ακτινοβολίες μικρής LET, όπως τα ηλεκτρόνια ή τα φωτόνια [2] .

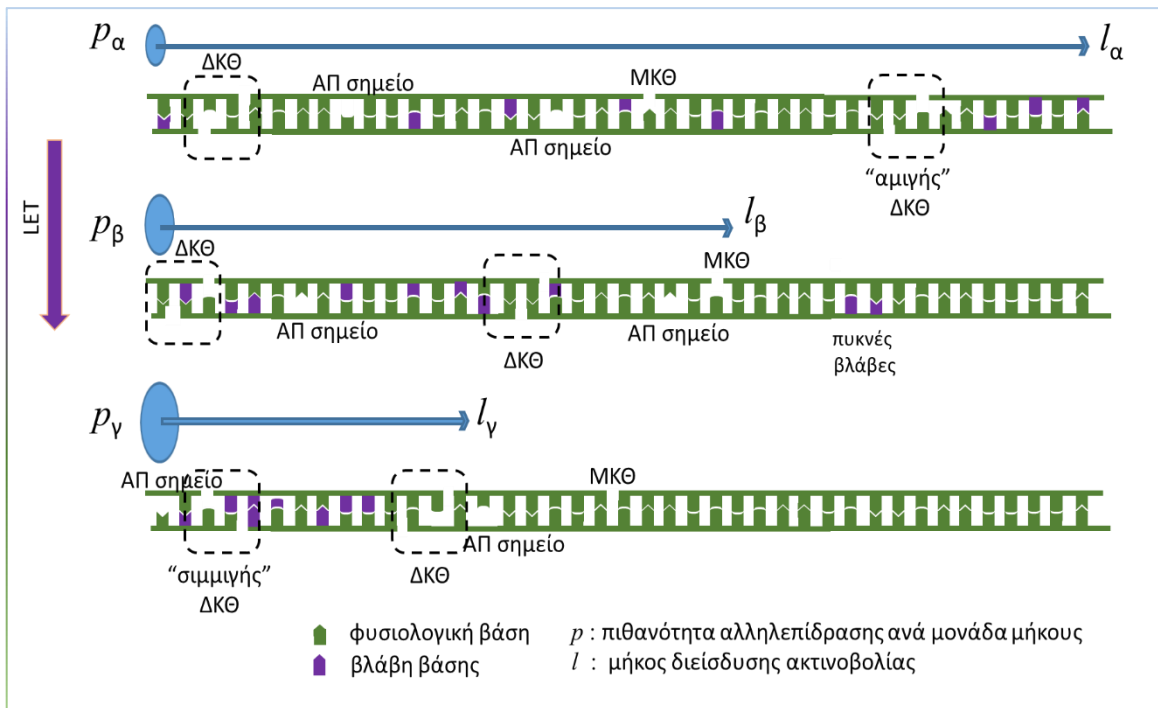


Σχήμα 1-1: Διάχυση των βλαβών του DNA μετά από έκθεση σε υπεροξείδιο του Υδρογόνου, ακτινοβολήση με ΙΑ χαμηλής και υψηλής γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (LET). Οι ρίζες \*OH από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διαχέονται ομοιόμορφα, επάγοντας έτσι εξίσου ομοιόμορφη κατανομή των βλαβών στο DNA. Στην περίπτωση της ΙΑ, οι ιοντισμοί συμβαίνουν κατά μήκος της τροχιάς του σωματιδίου [στο μεσαίο σχήμα παριστώνται ηλεκτρόνια (e<sup>-</sup>) ενέργειας 0.5 και 10 keV, στο δεξιό σχήμα σωματίδια α ενέργειας 4 MeV] επάγοντας σύνθετες βλάβες όπως φαίνεται στο σχήμα (Schipler and Iliakis, 2013 [1]).

### Σύνθετες βλάβες DNA

Καθώς αυξάνεται η LET οι βλάβες στο DNA, για δεδομένη αρχική ενέργεια σωματίου, γίνονται πυκνότερες. Ακολουθεί ένα παράδειγμα στη μία διάσταση. **Σχήμα I-2** Τρία σωματίδια (α, β και γ) φέροντα αρχικώς την ίδια ενέργεια, αλλά χαρακτηριζόμενα από διαφορετική LET αλληλεπιδρούν με το μόριο του DNA. Έστω ότι  $LET_{\alpha} < LET_{\beta} < LET_{\gamma}$ , τότε προκύπτει ότι για τις πιθανότητες αλληλεπίδρασης ανά μονάδα μήκους θα ισχύει  $p_{\alpha} < p_{\beta} < p_{\gamma}$ . Συνακόλουθα θα ισχύει  $l_{\alpha} > l_{\beta} > l_{\gamma}$ , όπου  $l$  το μήκος διείσδυσης της ακτινοβολίας, δηλαδή η απόσταση που θα διανύσει το σωματίο μέχρις αποδώσει όλη του την ενέργεια προκαλώντας βλάβες στο DNA. Οι συνήθεις βλάβες στο DNA μπορεί να είναι βλάβες βάσεων, αβασικά σημεία -απουρινικά/απουριμιδινικά-(abasic sites-AP), μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις (MKΘ ή ΔΚΘ) στο DNA. Καθώς και τα τρία σωματίδια φέρουν την ίδια ενέργεια, έχοντας έτσι τη δυνατότητα να προκαλέσουν τον ίδιο αριθμό αλλοιώσεων και διανύουν διαφορετικά διαστήματα μέχρις αποδώσουν όλη τους την ενέργεια, το σωματίο με τη μεγαλύτερη LET, θα διανύσει τη μικρότερη απόσταση, προξενώντας πιο πυκνές βλάβες. Οι βλάβες επισυμβαίνουν πυκνότερες, στο παρόν παράδειγμα 2 ΔΚΘ, 1 MKΘ, 2

ΑΠ και 8 βλάβες βάσεων, διότι ο ίδιος αριθμός από αυτές πρόκειται να προκληθεί σε μικρότερο τμήμα του DNA.



Σχήμα 1-2: Καθώς αυξάνεται η LET οι βλάβες στο DNA γίνονται πυκνότερες (ομαδοποιημένες). (μεταφρασμένο σχήμα από το Nikitaki et. al., 2015) [4].

## 1.2 Παράγοντες επαγωγής βλαβών DNA

Οι βλάβες στο DNA μπορεί να οφείλονται είτε σε ενδογενείς είτε σε εξωγενείς παράγοντες, όπως οι κοσμικές ακτίνες  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ή τα σωματίδια-α που απελευθερώνονται από τη διάσπαση του ραδονίου. Ενδογενώς, τα υποπροϊόντα της φυσιολογικής μεταβολικής διεργασίας, όπως οι οξειδωμένες πρωτεΐνες και τα λιπίδια ενδέχεται να προκαλέσουν βλάβη στο DNA, με σοβαρότατες επιπτώσεις στην ακεραιότητα των κυττάρων και στη λειτουργικότητα του οργανισμού [3]. Στους ενδογενείς παράγοντες εντάσσονται οι μεταβολικές διεργασίες και το οξειδωτικό στρες, αλλά και τα τυχόν λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή και διπλασιασμό του DNA αλλά και οι πιθανές σχετικές θραύσεις. Στους εξωγενείς παράγοντες εντάσσονται οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες, χημικοί παράγοντες από το περιβάλλον ή τις συνήθειες του ανθρώπου, όπως το κάπνισμα [4].

## 1.3 Βλάβες DNA

### 1.3.1 Βλάβες βάσεων

Μεμονωμένες βάσεις του DNA μπορούν να υποστούν χημική βλάβη προερχόμενη από διάφορους μηχανισμούς, με τους πιο κοινούς να είναι η απαμίνωση, η οξείδωση και η αλκυλίωση. Είναι πιθανό λόγω αυτών των τροποποιήσεων να επηρεαστεί η ικανότητα της βάσης να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου, με δυνητικό αποτέλεσμα σε λανθασμένη αντιστοιχία βάσεων και συνεκδοχικά να προκληθούν μεταλλάξεις στο DNA. Για παράδειγμα, η ενσωμάτωση της αδερίνης από την 8-οξογουανίνη κατά την αντιγραφή του DNA προκαλεί τη μετατροπή του ζεύγους G:C στο ζεύγος T:A. Άλλα παραδείγματα βλαβών βάσεων που επιδιορθώνει ο Μηχανισμός Εκτομής Βάσης: (i) οξειδωμένες βάσεις: 8-οξο-γουανίνη (FapyG), και 2,6-διάμινο-4-υδροξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη (FapyA), (ii) αλκυλιωμένες βάσεις: 3-μεθυλ-αδερίνη, 7-μεθυλ-γουανίνη, (iii) απαμινωμένες βάσεις: υποξανθίνη σχηματιζόμενη από απαμίνωση της αδερίνης, θυμίνη προερχόμενη από απαμίνωση της 5-μεθυλ-κυτοσίνης, (iv) λανθασμένη εισαγωγή ουρακίλης στο DNA είτε προερχόμενη από απαμίνωση της κυτοσίνης [5, 6].

### 1.3.2 Μονόκλωνες θραύσεις

Όταν η υπεριώδης ακτινοβολία ή οι ακτίνες-Χ αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού δημιουργούνται δραστικές μορφές οξυγόνου, γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία ως ROS (reactive oxygen species) και άλλες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν διακοπές ή και θραύσεις του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Όταν η βλάβη εκτείνεται μόνο στον έναν κλώνο της διπλής έλικας, τότε η βλάβη λέγεται «Μονόκλωνη Θραύση» (ΜΚΘ). Αφότου ανιχνευτεί η παρουσία της βλάβης τότε το κύτταρο επιστρατεύει είτε το μηχανισμό BER ή το μηχανισμό NER, οι οποίοι περιγράφονται στο επόμενο κεφάλαιο [7].

### 1.3.3 Αναντιστοιχίες βάσεων κατά την αντιγραφή

Κάποιο τυχαίο σφάλμα μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, όταν δηλαδή το κύτταρο διπλασιάζει το DNA του με σκοπό στη συνέχεια να διαιρεθεί σε δύο νέα κύτταρα. Το σφάλμα εμφανίζεται στο θυγατρικό κλώνο και μπορεί να αποτελεί είτε τοποθέτηση λανθασμένης βάσης, που να μην υπακούει στον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, είτε παράληψη μίας βάσης ή προσθήκη μιας πλεονάζουσας βάσης. Άλλο είδος σφάλματος αναντιστοιχίας αποτελούν οι διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ των βάσεων κυτοσίνη και θυμίνη, δημιουργώντας

διμερή πυριμιδίνων ή διασταυρούμενες συνδέσεις CpG, προερχόμενες από φάρμακα χημειοθεραπείας όπως το cisplatin και το carboplatin [7]. Αυτές οι διασταυρούμενες συνδέσεις συνήθως έχουν εξωγενή προέλευση, όπως τη φωτοχημική αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας UV-B με το διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα (C=C) που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ της θυμίνης και της κυτοσίνης [8]. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για την επιδιόρθωση τέτοιων βλαβών είναι κυρίως ο NER αλλά και ο MMR, μηχανισμοί που αναλύονται στα επόμενα.

#### **1.3.4 Δίκλωνες θραύσεις**

Το πιο επικίνδυνο είδος βλάβης είναι οι δίκλωνες θραύσεις (ΔΚΘ) του DNA, όπου και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας έχουν διαρρηχθεί. Η δίκλωνη θραύση μπορεί να περιγραφεί και ως δύο ΜΚΘ ευρισκόμενες στους απέναντι κλώνους, σε κοντινή απόσταση μέχρι 15-20 ζεύγη βάσεων DNA. Οι μηχανισμοί για την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination HR) και μη-ομόλογη ένωση άκρων (non-homologous end joining-NHEJ) και περιγράφονται αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο «Επιδιόρθωση βλαβών DNA».

### **1.4 Σύνθετες βλάβες DNA**

Το ενδογενές οξειδωτικό στρες αλλά κυρίως η ιοντιζουσα ακτινοβολία (ΙΑ) μπορεί να δημιουργήσουν πυκνές βλάβες στο DNA οι οποίες ονομάζονται σύνθετες βλάβες ή συστάδες βλαβών (clustered DNA lesions) ή τοπικώς εντοπισμένες πολλαπλές βλάβες (locally multiply damage sites), όπως πρώτος τις εισήγαγε ο John Ward [9]. Στις σύνθετες βλάβες εντάσσονται και οι δίκλωνες θραύσεις, των οποίων η πολυπλοκότητα μπορεί να ποικίλει (**Σχήμα II-1**) αλλά και μη-ΔΚΘ ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες (non-DSB oxidative clustered DNA lesions (OCDLs)). Οι συστάδες βλαβών, αποτελούν το χαρακτηριστικό αποτόπωμα της ιοντιζουσας ακτινοβολίας και το κότταρο δυσκολεύεται ιδιαίτερα να τις επιδιορθώσει [10].

#### **1.4.1 Μηχανισμοί επαγωγής σύνθετων βλαβών DNA**

Η ιοντιζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο DNA είτε λόγω της άμεσης εναπόθεσης ενέργειας στο μακρομόριο του DNA είτε έμμεσα από την επίδραση των χημικώς δραστικών ουσιών που σχηματίζονται πλησίον του μακρομορίου [11, 12].

Η έμμεση δράση κυρίως προκαλείται από το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ) μέσω της ραδιόλυσης του ύδατος σε απόσταση από το DNA εγγύτερη των 10 nm. Η μέση

απόσταση διάχυσης της  $\cdot\text{OH}$  σε κυτταρικό περιβάλλον έχει υπολογιστεί στα περίπου 6 nm [13], δηλαδή περίπου τρεις φορές η διάμετρος της διπλής έλικας [14]. Εξαιτίας της μικρής εμβέλειας των  $\cdot\text{OH}$  και της αυξημένης «πυκνότητας» που απαιτείται να έχουν οι βλάβες ώστε να χαρακτηριστούν ομαδοποιημένες, οι συστάδες βλαβών δημιουργούνται μόνο εφόσον 2 έως 5 ιονισμοί επισυμβαίνουν σε μία περιοχή του DNA διαμέτρου 1-4 nm. Οι βλάβες αυτές έχουν τότε τη δυνατότητα να προκαλέσουν μία ΔΚΘ [15]. Επιπλέον η μέση απόσταση διάχυσης μπορεί να εξαρτάται από τη θέση των μορίων του νερού και των άλλων ελεύθερων ή και προσδεδωμένων συστατικών του κυττάρου που βρίσκονται κοντά στο μόριο του DNA. Μια πρώτη προσέγγιση της απόστασης διάχυσης των ριζών  $\cdot\text{OH}$  δίδεται από δημοσιευμένους υπολογισμούς. Για ακτινοβολίες χαμηλής LET υπό ορθοξικές συνθήκες, προσομοιώσεις Monte Carlo προβλέπουν ότι ένα ποσοστό 60% των ΜΚΘ αποτελούνται από μία θραύση κλώνου και ότι οι υπόλοιπες ΜΚΘ (40%) αποτελούνται από δύο ή και περισσότερες βλάβες [16]. Επίσης για ακτινοβολίες χαμηλής LET ( $< 1 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), υπολογίζεται ότι περίπου το 50% των μεμονωμένων βλαβών προέρχονται από μη (άμεσα ή εμμέσως) εκκαθαρίσιμους (non-scavengable) μηχανισμούς ενώ οι εναπομένουσες βλάβες είναι εκκαθαρίσιμες [16], σε συμφωνία με την εκτίμηση ότι ένα ποσοστό 50 - 65% των βλαβών στο DNA που προκαλεί η ακτινοβολία ερμηνεύεται από έμμεσα φαινόμενα [13, 17]. Ως μη εκκαθαρίσιμες ορίζονται, κατά τους ερευνητές που έτρεξαν τις προσομοιώσεις [16], οι βλάβες εκείνες που ακόμα και εάν υποθετικά στο κύτταρο υπήρχε πολύ μεγάλη συγκέντρωση εκκαθαριστών/αδρανοποιητών<sup>1</sup> των ελεύθερων ριζών<sup>2</sup>, θα ήταν και πάλι παρούσες. Καθώς η εναπόθεση ενέργειας είναι ανάλογη της μάζας, οι πουρίνες (αδενίνη και γουανίνη) και οι πυριμιδίνες έχουν περίπου την ίδια πιθανότητα να υποστούν βλάβη από τον άμεσο μηχανισμό. Επιπλέον και τα τέσσερα είδη βάσεων εμφανίζουν περίπου την ίδια ευαισθησία στις  $\cdot\text{OH}$  [12]. Τα ηλεκτρόνια και τα λοιπά είδη ιοντιζουσας ακτινοβολίας επιφέρουν περί τις  $217 \pm 22$  (~10%) θραύσεις βάσεων  $\text{Gy}^{-1} \text{Gbp}^{-1}$  και περί τις  $650 \pm 65$  (~10%) βλάβες βάσεων  $\text{Gy}^{-1} \text{Gbp}^{-1}$  [[20] καθώς και οι αναφορές που περιέχονται σε αυτήν], οι οποίες αντιστοιχούν σε μία αναλογία περίπου τριών βλαβών βάσεων ανά θραύση κλώνου [9].

---

<sup>1</sup> **Εκκαθαριστής/αδρανοποιητής (scavenger):** στη χημεία: μία ουσία που προστίθεται σε ένα μίγμα για να απομακρύνει ή να απενεργοποιήσει ακαθαρσίες [18].

<sup>2</sup> **Εκκαθαριστής/αδρανοποιητής ελεύθερων ριζών (free radical scavenger):** ουσία που αντιδρά σε ένα βιολογικό περιβάλλον με τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας από τα έμμεσα φαινόμενα που εκείνες προκαλούν, οι οποίες συνήθως προέρχονται από την ιοντιζουσα ακτινοβολία. Συνήθως το ρόλο των εκκαθαριστών στο κύτταρο αναλαμβάνουν τα φυσικά χημικά ή ενζυμικά αντιοξειδωτικά [19].



Συνοψίζοντας, οι μονές, ευρέως διεσπαρμένες βλάβες στο DNA συνήθως ταξινομούνται ως μεμονωμένες θραύσεις κλώνου, ως οξειδωμένες βάσεις, ή ως απουρινικά-απουριμιδικά (apurinic-apyrimidinic -AP) ή αβασικά σημεία [11, 21, 22]. Παρόλο που έχουν αναπτυχθεί πολλές πειραματικές μέθοδοι για την ανίχνευση των πυκνών μεμονωμένων βλαβών, η ανίχνευσή τους παραμένει ένας δύσκολος στόχος [23]. Ως εκ τούτου, όταν αναφερόμαστε σε μία μονόκλωνη θραύση (ΜΚΘ) δεν εννοούμε απαραίτητα μία μεμονωμένη θραύση που δε συνοδεύεται από καμία άλλη βλάβη σε απόσταση ( $>$  των 10 με 20 bp). Ήτοι, η πειραματικώς ανιχνευόμενη βλάβη που κατατάσσεται ως ΜΚΘ, συνήθως συνοδεύεται και από βλάβες βάσεων ή και αβασικά σημεία. Για να γίνει η διάκριση μεταξύ των καθαρών ΜΚΘ και αυτών που συνοδεύονται και από άλλες βλάβες, οι δεύτερες αναφέρονται και ως σύνθετες ΜΚΘ. Δύο μονόκλωνες θραύσεις πολύ κοντινές και ευρισκόμενες στον ίδιο κλώνο πολλές φορές μετρούνται ως μία μονήρη ΔΚΘ.

#### **1.4.2 Η βιολογική σημασία των σύνθετων βλαβών DNA**

Η βιολογική σημασία των ομαδοποιημένων βλαβών DNA (σύνθετων ΔΚΘ, ή μη ΔΚΘ) είναι πλέον αποδεκτή και αποδίδεται στην ανικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώσουν είτε πλήρως είτε επιτυχώς τη μεγάλη ποικιλία συνδυασμών των σύνθετων βλαβών DNA. Πρόσφατες πειραματικές μελέτες και βιοπληροφορικές αναλύσεις υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα της δυσκολίας του κυττάρου να επιδιορθώσει τις ομαδοποιημένες βλάβες καθώς και τη συνεισφορά τους στην πρόκληση γενετικής αστάθειας [7, 24]. Εκτεταμένες μελέτες έχουν φανερώσει την αξιοσημείωτη καθυστέρηση στην επεξεργασία και επιδιόρθωση αυτών των ομαδοποιημένων βλαβών που προκλήθησαν σε κύτταρα εκτεθειμένα σε ακτινοβολίες χαμηλής [25, 26] είτε υψηλής LET [27], όπως επίσης και σε ολιγονουκλεοτίδια DNA που έφεραν συγκεκριμένου είδους ομαδοποιημένες βλάβες [22, 28]. Η -μετά την ακτινοβόληση- μετατροπή αυτών των ομαδοποιημένων βλαβών σε νέες (de novo) ΔΚΘ αναδεικνύει μία επιπρόσθετη αιτία για τη βιολογική και την κλινική τους σημασία [26, 29]. Η παρουσία των διαφόρων ειδών βλάβης έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη εκκίνηση διαφορετικών μηχανισμών επιδιόρθωσης, για παράδειγμα της Μη Ομόλογης Ένωσης Άκρων (MOEA, non-homologues end joining-NHEJ) ή του Ομόλογου Ανασυνδυασμού (OA, homologues recombination-HR) για την επιδιόρθωση των ΔΚΘ [30] και του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης (MEB, base excision repair-BER) για τις βλάβες βάσεων. Η ταυτόχρονη εκκίνηση μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA θεωρείται ότι αποτελεί για το κύτταρο δύσκολο στόχο και συχνά το αποτέλεσμα είναι η ανεπιτυχής ή η λανθασμένη επιδιόρθωση. Μπορεί να αποκαθίσταται η ακεραιότητα της αλυσίδας αλλά

να έχει αλλάξει η αλληλουχία των βάσεων με αποτέλεσμα την αλλοίωση της πληροφορίας που μεταφέρει, οδηγώντας σε μεταλλάξεις [21] και μακροπρόθεσμα σε γονιδιωματική/χρωμοσωματική αστάθεια [31, 32]. Διάφορα μοντέλα, ιδιαίτερος στην περίπτωση των ακτινοβολιών υψηλής LET έχουν δείξει τη σπουδαιότητα των σύνθετων ΔΚΘ, δύο ή περισσότερων ΔΚΘ σε πολύ κοντινή μεταξύ τους απόσταση [33, 34], επιπλέον ως σύνθετη δίκλωνη θραύση νοείται και μία δίκλωνη θραύση συνοδευόμενη από άλλες βλάβες [35, 36]. Μάλιστα, οι Schipler and Iliakis [1] ταξινομούν τα είδη των δίκλωνων θραύσεων κατά αυξανόμενη πολυπλοκότητα σύμφωνα με το **Σχήμα 1-3**:

Ως ΔΚ θραύση Τύπου 1 (T1) θεωρείται η απλούστερη θραύση η οποία έχει δύο απλές διακοπές του φωσφοδιεστερικού δεσμού σε αμφοτέρους τους κλώνους, στους σακχαροφωσφορικούς σκελετούς, χωρίς τη χημική αλλοίωση άλλου μορίου. Τέτοιου είδους θραύσεις επάγονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Θεωρητικά είναι δυνατή η απλή επανασύνδεση των κλώνων. Ως ΔΚ θραύσεις Τύπου 2 (T2) ορίζονται οι θραύσεις που έχουν προέλθει από ΙΑ και έχουν συνήθως κοινό χαρακτηριστικό τη βλάβη πεντόζης στο δημιουργούμενο 3'-φωσφογλυκολικό άκρο (3'-phosphoglycolate), με οξείδωση της (ετεροκυκλικής<sup>3</sup>) δεοξυριβόζης στο άκρο 3'.

Καθώς υπάρχει η χημική τροποποίηση των άκρων, για την επιδιόρθωση της θραύσης απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο πριν την αποκατάσταση του φωσφοδιεστερικού δεσμού [38]

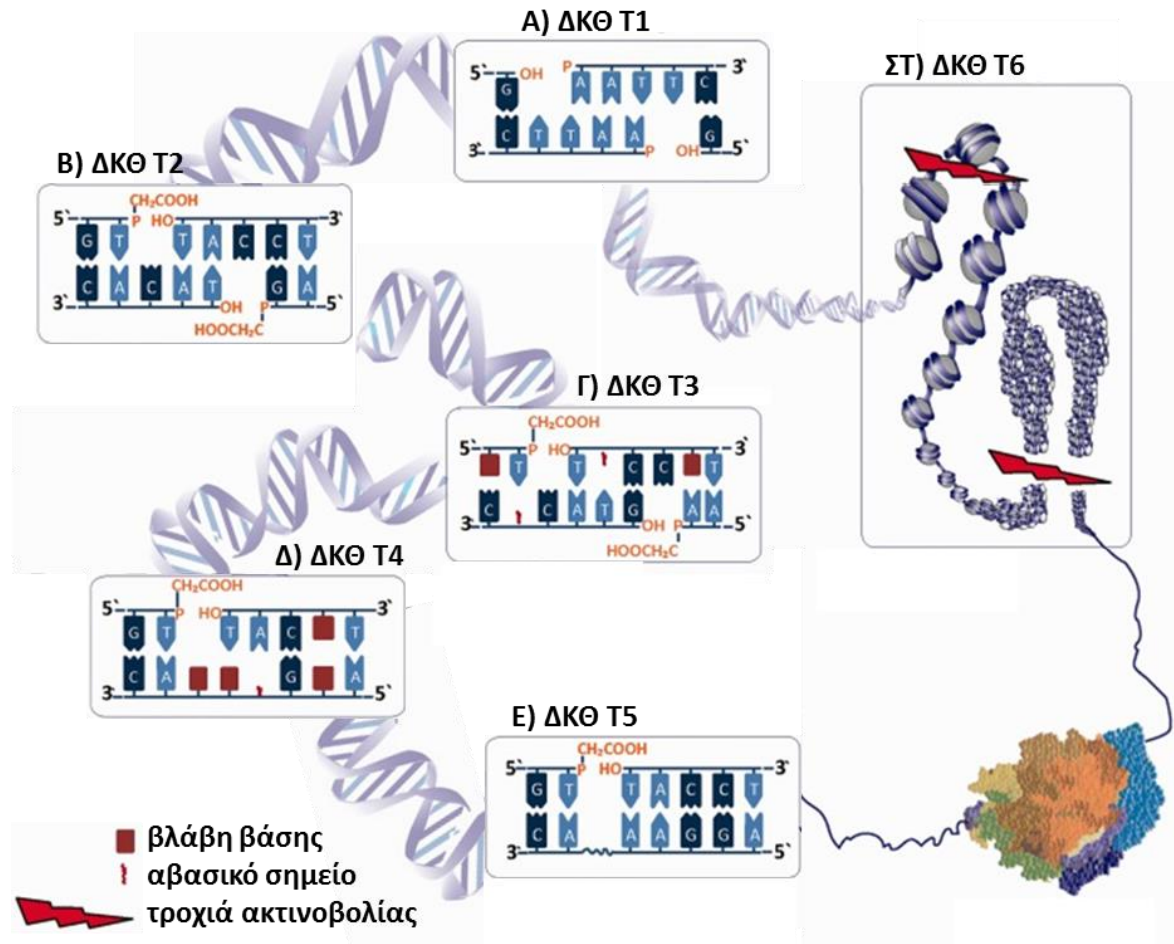
Ως ΔΚ θραύσεις Τύπου 3 (T3), οι συγγραφείς χαρακτηρίζουν τις ΔΚΘ που έχουν προέλθει από ακτινοβολία υψηλότερης LET και για αυτό εκτός από τα χημικώς τροποποιημένα άκρα συνοδεύονται και από βλάβες βάσεων. Αυτές οι βλάβες απαιτούν την έναρξη περισσότερων μηχανισμών επιδιόρθωσης για να εξαλειφθούν.

Ως ΔΚ θραύση Τύπου 4 (T4), χαρακτηρίζεται η θραύση που προκύπτει εμμέσως από την ενζυματική επεξεργασία άλλων βλαβών, όπως βλαβών βάσεων. Στο σχήμα παρουσιάζεται μία μονόκλωνη θραύση και στον απέναντι κλώνο μία απώλεια βάσης, δηλαδή ένα αβασικό σημείο. Εάν η επιδιόρθωση του αβασικού σημείου γίνει με το Μηχανισμό Εκτομής Νουκλεοτιδίου, τότε θα υπάρξει και μία δεύτερη μονόκλωνη θραύση, απέναντι από την πρώτη, δηλαδή θα προκύψει μία ΔΚΘ. Το πρόβλημα για το κύτταρο όταν συμβεί μία τέτοιου είδους δίκλωνη θραύση, είναι ότι καθώς έχει να αναγνωρίσει ταυτόχρονα δύο προβλήματα, οι πρωτεΐνες του ενός μηχανισμού που θα ξεκινήσει πρώτος, καθώς θα είναι

---

<sup>3</sup> **Ετεροκυκλική ένωση:** κυκλική ένωση που ο δακτύλιός της αποτελείται από τουλάχιστον δύο διαφορετικά είδη ατόμων [37]

παρούσες στην εγγύς περιοχή της δεύτερης βλάβης, να δυσκολέψουν το κότταρο στην αναγνώριση της δεύτερης βλάβης.



Σχήμα 1-3: Αναπαράσταση των διαφόρων τύπων δίκλωνων θραύσεων που αναφέρονται στο κείμενο. Α) ΔΚΘ T1 είναι το απλούστερο είδος ΔΚΘ, αποτελείται από δύο διακοπές του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Τέτοιες ΔΚΘ επάγονται από τις περιοριστικές ενδοουκλεάσες. Β) ΔΚΘ T2: επάγονται από ΙΑ και συχνά περιλαμβάνουν ένα 3'φωσφογλυκολικό και ένα 5'OH άκρο. ( Γ) Η ΙΑ επάγει επίσης ομαδοποιημένες βλάβες, που ορίζονται ως ΔΚΘ T3. Στην περίπτωση αυτή η ΔΚΘ που έχει προκληθεί με άμεσο τρόπο συνοδεύεται από άλλα είδη βλαβών, όπως αλλοιώσεις βάσεων ή αβασικά σημεία. Δ) Η ΔΚΘ T4 αποτελείται από συστάδες βλαβών οι οποίες μετατρέπονται σε δίκλωνες θραύσεις έπειτα από την ενζυματική τους επεξεργασία. Επομένως λέμε ότι επάγονται με έμμεσο τρόπο. Ε) Και οι ΔΚΘ T5 επάγονται με έμμεσο τρόπο, έως και 1 h μετά την ακτινοβολία από τη θερμικώς ευαίσθητη χημική επεξεργασία των σακχάρων που φέρουν βλάβη και βρίσκονται απέναντι από κάποια ΜΚΘ. ΣΤ) Οι ΔΚΘ T6 αποτελούνται από συστάδες ΔΚΘ και είναι δυνατόν να αποσταθεροποιήσουν τη χρωματίνη. Παριστώνται στο σχήμα δύο πιθανές εκδοχές: πάνω αριστερά, η ακτινοβολία επάγει δύο ΔΚΘ εκατέρωθεν ενός νουκλεοσώματος, με δυνητικό αποτέλεσμα την απώλεια αυτού. Η δεύτερη εκδοχή (κάτω δεξιά) αναφέρεται στην περίπτωση όπου η χρωματίνη παρουσιάζει ανώτερης τάξης συμπύκνωση, και ταυτοχρόνως έχει δημιουργηθεί μία θηλιά, λόγω της αναδίπλωσης. Σε αυτή λοιπόν την περίπτωση είναι δυνατόν να χαθούν μεγαλύτερα τμήματα χρωματίνης (Από τη δημοσίευση των Schipler and Pliakis, 2013 [1])

Ως ΔΚ θραύσεις τύπου 5 (T5) κατατάσσονται οι ΔΚΘ που προκύπτουν από θερμικώς ασταθή σημεία (thermal labile sites). Εκτός λοιπόν από τις άμεσες ΔΚΘ (prompt) που επάγει η ΙΑ υπάρχουν και άλλες βλάβες που κατά τη χημική τους επεξεργασία μετατρέπονται σε μονόκλωνες θραύσεις. Και όταν στον απέναντι κλώνο ήδη υπάρχει άλλη μία μονόκλωνη θραύση τότε δημιουργείται μία θερμικώς ευάλωτη ή ασταθής ΔΚΘ.

Πήραν έτσι την ονομασία τους αυτές οι θραύσεις επειδή αρχικά εθεωρείτο ότι προκύπτουν μόνο κατά τη θερμική επεξεργασία σε υψηλές μη φυσιολογικές για το κύτταρο θερμοκρασίες (~50 °C για τη λύση του κυττάρου για την ανάλυση των θραύσεων) που χρησιμοποιούνταν πειραματικά για τον προσδιορισμό των θραύσεων. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι αυτές οι πρόσθετες θραύσεις αυξάνουν πλασματικά τον αριθμό των ΔΚΘ και θα έπρεπε η συνεισφορά τους να υπολογίζεται και να αφαιρείται από το αποτέλεσμα. Ενδιαφέρον όμως προκαλεί αυτό που προτείνει η ίδια ομάδα σε άλλες εργασίες τις [39-41] ότι δηλαδή και η ίδια η ΙΑ προκαλεί τέτοιου είδους βλάβες, θερμικώς ασταθείς βλάβες, οι οποίες μέσα στην πρώτη ώρα μετά την ακτινοβόληση μετατρέπονται και εκείνες σε θραύσεις, όπου εάν είναι πυκνές δύνανται να δημιουργήσουν πρόσθετες ΔΚΘ. Οι δυσκολίες στην επιδιόρθωση που αναφέρθηκαν για τις ΔΚΘ T4, ισχύουν και σε αυτήν την περίπτωση.

Τέλος ως ΔΚ θραύσεις Τύπου 6 (T6), οι συγγραφείς ταξινομούν συστάδες ΔΚΘ, όπου κάθε μία από αυτές μπορεί να εντάσσεται σε κάποιον από τους προηγούμενους πέντε τύπους. Οι ΔΚΘ T6, φαινομενικά διαταράσσουν το κύτταρο όπως και οι προηγούμενες θραύσεις. Όμως η ύπαρξη πολλών ΔΚΘ σε κοντινή μεταξύ τους απόσταση, μπορεί να διαταράξει και την ακεραιότητα του χρωμοσώματος. Κατά την επιδιόρθωση είναι πιθανόν να χαθούν ολόκληρα νουκλεοσώματα. Προκαλείται χρωμοτρυψία σε μεγάλο βαθμό και μια τέτοια κατάσταση είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη για το κύτταρο, διότι τέτοιου είδους τροποποιήσεις είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στην καρκινογένεση [42-45].

Η ιδέα της ενεργοποίησης και εμπλοκής πολλαπλών μονοπατιών επιδιόρθωσης αποτελεί πιθανότατα για το κύτταρο μια πραγματική μορφή στρες, ενεργοποίησης σημάτων κινδύνου και υπήρξε ουσιαστικά η θεωρητική βάση για την ανάπτυξη των διάφορων τεχνικών ανίχνευσης με μικροσκοπία φθορισμού [46], βάσει του συνεντοπισμού εστιών φθορισμού, που προέρχεται από τα φθορίζοντα αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης [47]. Οι πολλαπλές βλάβες στο DNA ιδιαίτερα στην περίπτωση ακτινοβολιών υψηλού LET είχε προβλεφθεί από πολύ παλιά από προσομοιώσεις Monte Carlo [48, 49].

## 1.5 Θεωρητική πρόβλεψη επαγωγής βλαβών DNA

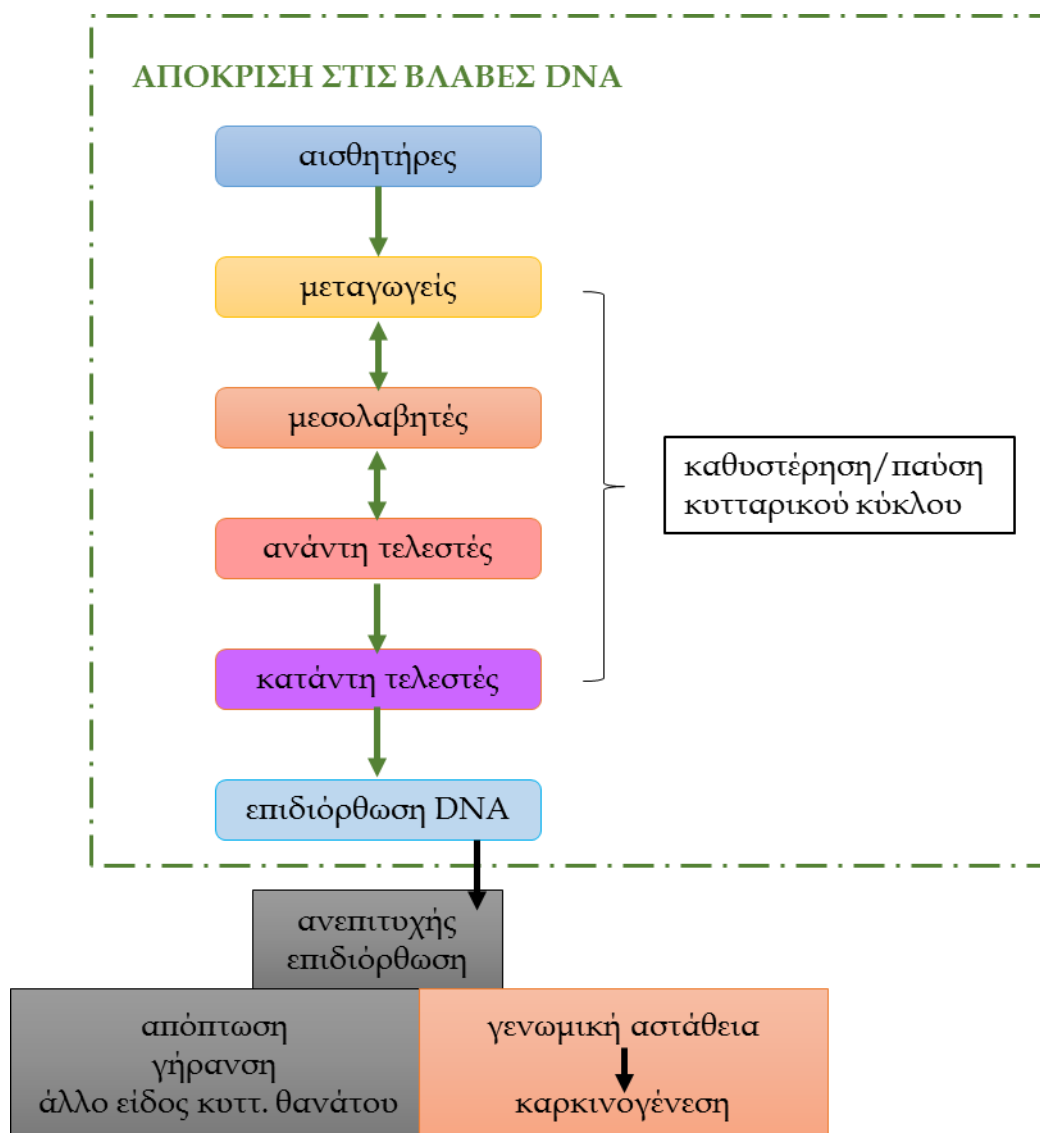
Για δόσεις μέχρι και 1 Gy θεωρείται με καλή προσέγγιση ότι κατά μέσο όρο ένα ή δύο το πολύ ανεξάρτητα σωματίδια διασχίζουν έναν όγκο σε σχήμα κυττάρου, ίσο με μία εστία  $\gamma$ -H2AX, δηλαδή διαμέτρου 500 nm. Καθώς μία εστία αντιστοιχεί σε μία δίκλωνη θραύση, γίνεται η παραδοχή ότι ο σχηματισμός των εστιών φθορισμού οφείλεται σε φαινόμενα μιας μόνης τροχιάς στο επίπεδο του DNA (1-10nm).

Η ικανότητα των ακτινοβολιών να επάγουν σύνθετες βλάβες μπορεί να ερμηνευθεί μέσω της χωρικής κατανομής εναπόθεσης ενέργειας στην ύλη. Στην παρούσα διατριβή, η βιολογική ύλη προσεγγίζεται/προσομοιώνεται μέσω του νερού, και οι διαφορετικές ποιότητες ακτινοβολίας προσομοιώνονται με ηλεκτρόνια διαφορετικών ενεργειών (και διαφορετικού πλήθους). Η προσέγγιση αυτή είναι αρκετά ακριβής, καθώς η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας οφείλεται ως επί το πλείστον στα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία παράγονται σε αφθονία κατά τη διέλευση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

## 2 ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA

### 2.1 Μηχανισμοί απόκρισης στις βλάβες (DNA damage response-DDR)

Ως «απόκριση στις βλάβες του DNA» που στη διεθνή βιβλιογραφία απαντάται ως “DNA damage response” ορίζεται το δίκτυο των κυτταρικών διεργασιών που ανιχνεύει τις βλάβες, στέλνει τα κατάλληλα σήματα και εν τέλει επιδιορθώνει τις βλάβες του DNA. Κατάλληλες πρωτεΐνες που ελέγχουν την ακεραιότητα του DNA, ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τους κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης, κατόπιν ανιχνεύσεως της βλάβης, προλαμβάνοντας έτσι τη δημιουργία δυνητικά επιβλαβών μεταλλάξεων.



Σχήμα 2-1: Απόκριση στις βλάβες DNA. (αναδημιουργία από Pateras, et al,2016)[24]

Αφού συμβεί η βλάβη, η οποία προέρχεται είτε από ενδογενή αίτια, όπως το οξειδωτικό στρες, είτε από εξωγενή, όπως η ιοντιζουσα ακτινοβολία, το πρώτο βήμα που απαιτείται

να συντελεστεί είναι η αναγνώριση, την οποία αναλαμβάνουν οι πρωτεΐνες-αισθητήρες (sensor proteins) οι οποίες προσελκούν και ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες κινάσες που είναι μεταγωγείς σήματος (transducer kinases). Οι μεταγωγείς σήματος μεταφέρουν το «σήμα κινδύνου» στις κινάσες που είναι ανάντη τελεστές (upstream effector kinases), οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τα αντίστοιχα δικά τους υποστρώματα, τους κατάντη τελεστές. Οι κατάντη τελεστές επιστρατεύουν το κατάλληλο μόριο επιδιόρθωσης DNA, ανάλογα με το είδος της βλάβης. Η επακριβής ρύθμιση (fine tuning) της απόκρισης στις βλάβες του DNA επιτελείται από τους μεσολαβητές (mediators) οι οποίοι είναι τα υποστρώματα και οι ρυθμιστές και των μεταγωγέων και των κινασών-τελεστών. Η επακόλουθη επιδιόρθωση μπορεί να περιλαμβάνει έναν μόνον από τους κυτταρικούς μηχανισμούς που περιγράφονται στην παράγραφο 1.3.2 ή και συνδυασμό αυτών, ανάλογα με την πολυπλοκότητα της βλάβης. Ο απαιτούμενος χρόνος για την επιδιόρθωση εξασφαλίζεται από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, τα οποία αναστέλλουν τα σύμπλοκα cyclin-CDK καθυστερώντας ή και σταματώντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Εάν η βλάβη στο DNA είναι εκτεταμένη ή δεν είναι επαρκώς επιδιορθωμένη το κύτταρο οδηγείται στην απόπτωση, στη γήρανση ή στην περίπτωση που επιζήσει, θα φέρει χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, οι οποίες δυνητικά θα επιφέρουν γονιδιωματική αστάθεια ή και καρκινογένεση [24].

## 2.2 Κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Όπως έχουν επικρατήσει στη βιβλιογραφία, οι κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι BER, NER, MMR, HR και NHEJ. Τα ακρωνύμια αντιστοιχούν στα Base Excision Repair, Nucleotide Excision Repair, Mismatch Repair, Homologous Recombination και Non Homologous End Joining. Αντίστοιχα, στη γλώσσα μας οι μηχανισμοί αυτοί αποδίδονται ως Μηχανισμός Εκτομής Βάσης (MEB), Μηχανισμός Εκτομής Νουκλεοτιδίων (MEN), Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (EA), Ομόλογος Ανασυνδυασμός (OA) και Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (MOEA). Όπως παρατηρούμε η κατηγοριοποίηση γίνεται με γνώμονα το μηχανισμό αφ' εαυτόν, και όχι με το είδος της βλάβης που έκαστος επιδιορθώνει, εκτός από την περίπτωση της EA/MMR όπου περιγράφεται το είδος της βλάβης.

### 2.2.1 BER (Base Excision Repair-Μηχανισμός Εκτομής Βάσης)

Ο Μηχανισμός Εκτομής Βάσης απομακρύνει μικρές, σε επίπεδο μιας έλικας, βλάβες βάσεων, ενώ ο NER επιστρατεύεται στην περίπτωση των πολλαπλών βλαβών, δηλαδή αυτών που υπερβαίνουν σε έκταση τη μία έλικα. Ο μηχανισμός BER αντικαθιστά τις

βάσεις που φέρουν βλάβες αλλά και επιδιορθώνει τις μονόκλωνες θραύσεις (SSB) της έλικας του DNA [50]. Ο BER ενεργοποιείται από γλυκοζυλάσες, οι οποίες αναγνωρίζουν και απομακρύνουν τις βάσεις που φέρουν βλάβες ή είναι ακατάλληλες. Οι βάσεις που εκτέμνονται μπορεί να είναι οξειδωμένες, αλκυλιωμένες ή απαμινωμένες. Με τον όρο ακατάλληλες εννοούμε για παράδειγμα την Ουρακίλη, η οποία δε φέρει μεν βλάβη, αλλά δεν έχει θέση στην αλληλουχία του DNA, μπορεί να έχει τοποθετηθεί κατά λάθος στη θέση της θυμίνης, απέναντι από μία αδενίνη, ενδέχεται επίσης η παρουσία της ουρακίλης να οφείλεται απαμίνωση της κυτοσίνης [51]. Ο μηχανισμός BER, λοιπόν, είναι χρήσιμος διότι προφυλάσσει το κύτταρο από μεταλλάξεις που θα συνέβαιναν αν δεν υπήρχε η αντικατάσταση αυτών των βάσεων. Μόλις απομακρυνθεί η ελαττωματική/ακατάλληλη βάση από τις γλυκοζυλάσες, στη θέση της μένει ένα αβασικό σημείο, το οποίο στη βιβλιογραφία συντέμνεται ως 'AP' (apurinic/apyrimidinic). Η αλυσίδα κόβεται από μία ενδονουκλεάση-AP. Στο στάδιο αυτό στη θέση της βλάβης έχει δημιουργηθεί μία μονόκλωνη θραύση της αλυσίδας του DNA (SSB-single strand break). Στο στάδιο αυτό επιλέγεται αν θα ακολουθηθεί το σύντομο ή το μακρύ μονοπάτι (short- or long- patch BER), όπου δεν είναι σαφές το κριτήριο με το οποίο γίνεται η επιλογή. Οι παράγοντες που εικάζεται ότι επηρεάζουν την επιλογή είναι το είδος της βλάβης, η φάση του κυτταρικού κύκλου, το αν το κύτταρο είναι πλήρως διαφοροποιημένο ή ενεργώς διαιρούμενο.

### **2.2.1.1 Σύντομος BER**

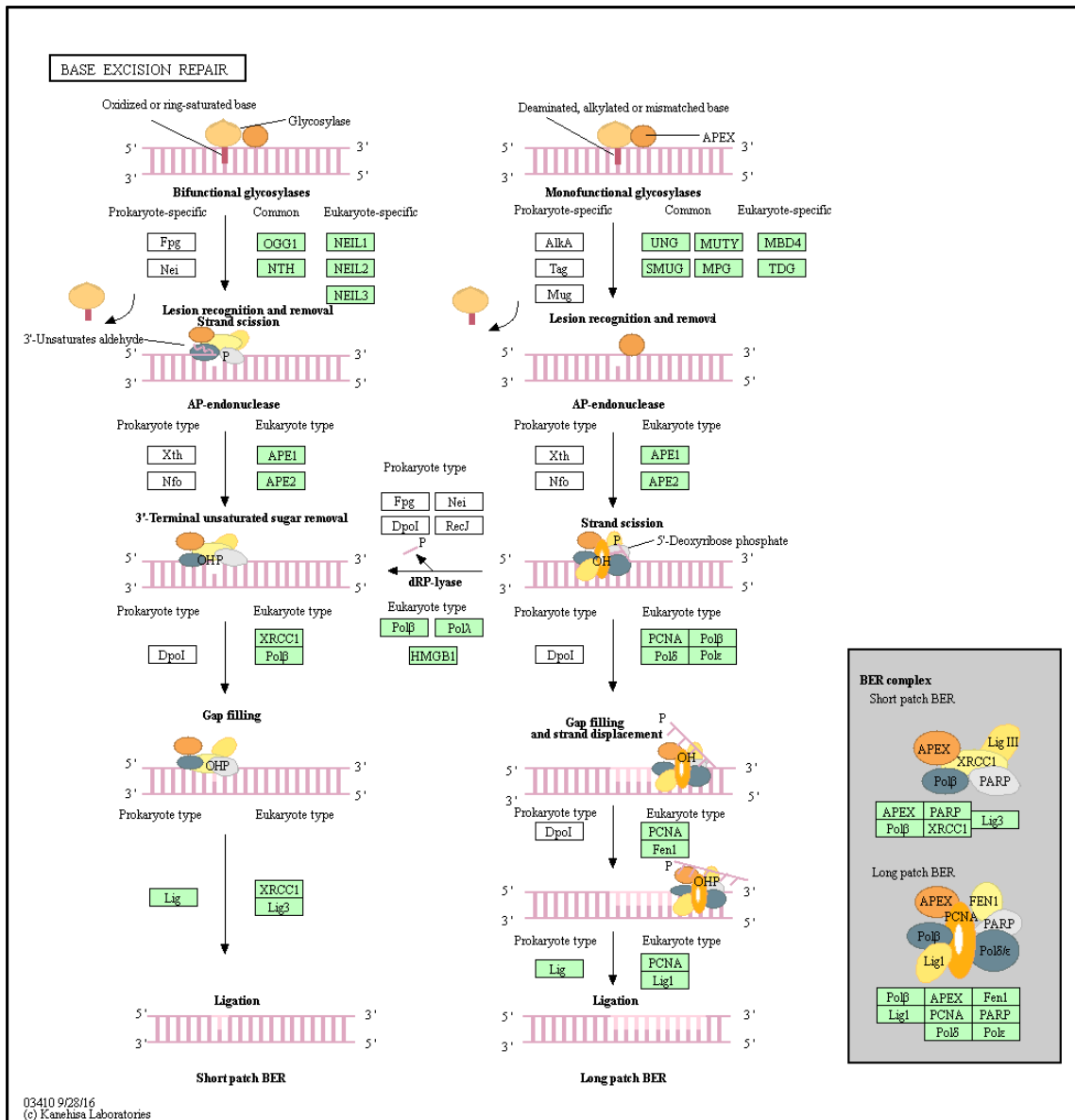
Οι γλυκοζυλάσες με τις οποίες ξεκινά ο BER μπορεί να είναι μονο-λειτουργικές ή δι-λειτουργικές. Στο σύντομο BER συμμετέχουν οι δι-λειτουργικές γλυκοζυλάσες οι οποίες εκτός από την ιδιότητά τους να καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση του γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ της βάσης και του σακχάρου δεοξυριβόζη, διαθέτουν επιπλέον και δραστηριότητα λυάσης-AP. Επομένως μπορούν να αποκόψουν την αλυσίδα χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία κάποιας ενδονουκλεάσης-AP. Οι πιο κοινές δι-λειτουργικές γλυκοζυλάσες είναι οι OGG1, NTH, NEIL1, NEL2, NEIL3. Με την απομάκρυνση της βάσης από τη γλυκοζυλάση, στη θέση της βλάβης υπάρχει τώρα μία μονόκλωνη θραύση, η οποία αναγνωρίζεται από πρωτεΐνες PARP1 ή PARP2. Οι PARP προσδένονται στη θέση της θραύσης και λειτουργούν ως σήματα, καλώντας άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης όπως οι XRCC1 (πρωτεΐνη σκαλωσιάς), LigIII (πρωτεΐνη συγκόλλησης), Polβ (πολυμεράση-β, πρωτεΐνη σύνθεσης). Όλες μαζί αυτές δημιουργούν ένα σύμπλεγμα το οποίο αρχικά απομακρύνει το 3'-ακόρεστη αλδεΐδη το σχηματισμό της οποίας προκάλεσε η απομάκρυνση της ελαττωματικής βάσης. Η αλδεΐδη αυτή εκτέμνεται από τις APE1 και



APE2. Στη συνέχεια η Polβ συνθέτει τη σωστή βάση και τέλος η Lig3 συγκολλά την αλυσίδα [52].

### 2.2.1.2 Μακρός BER

Ο μακρός BER ξεκινά με κάποια από τις μονο-λειτουργικές γλυκοζυλάσες, οι συνηθέστερες των οποίων είναι οι UNG και SMUG για την απομάκρυνση της ουρακίλης, MUTY (2-hydroxyadenine 2-υδροξυαδενίνη), MPG (DNA-3-methyladenine) , MBD4 (methylated DNA and is specific for G:T mismatches within methylated and unmethylated CpG sites.) [53] , TDG (G/T Mismatch-Specific Thymine DNA Glycosylase) [54, 55]. Μόλις απομακρυνθεί η γλυκοζυλάση που έχει πάρει μαζί της την ελλαττωματική ή τη λάθος τοποθετημένη βάση, η αλυσίδα παραμένει ακέραια και για να προχωρήσει η επιδιόρθωση, χρειάζεται να κοπεί, τη διαδικασία της κοπής την αναλαμβάνουν οι ενδονουκλεάσες APE1 ή APE2. Στη συνέχεια δημιουργείται ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, με κορμό την PCNA, η οποία λειτουργεί ως πλατφόρμα φόρτωσης για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του συμπλόκου που είναι οι APEX, PARP, Polβ, Polδ/Polε, FEN1 και Lig1. Το σύμπλοκο αυτό προχωρά με φορά 5'-3' εκτοπίζοντας έως και 8 νουκλεοτίδια, ενώ παράλληλα οι πολυμεράσες συνθέτουν νέα, με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση, το ένζυμο FEN1 αποκόπτει το πλεονάζον, παλαιό, ολιγονουκλεοτίδιο. Στο τέλος η Lig1 συγκολλά την αλυσίδα.



Σχήμα 2-2 :Ο μηχανισμός BER. Διακρίνεται στο σύντομο και το μακρό. Α) Ο σύντομος ξεκινάει με μια οξειδωμένη ή κορεσμένη-κυκλική βάση. Η συγκεκριμένη βλάβη αναγνωρίζεται από κάποια από τις δι-λειτουργικές γλυκοζυλάζες. Β) Η βάση απομακρύνεται μαζί με τη γλυκοζυλάση, η οποία έχει επιπλέον κόψει και το δεσμό μεταξύ δεοξυριβόζης και φωσφορικής ομάδας αφήνοντας και μία 3'-ακόρεστη αλδεΐδη. Η XRCC1 συγκρατεί το επιδιορθωτικό σύμπλεγμα που αποτελείται επιπλέον από τις APEX, Lig III, Polβ και PARP. Γ) Οι ενδονουκλεάσες απομακρύνουν το ακόρεστο σάκχαρο. Δ) Με τη βοήθεια της Polβ συμπληρώνεται το κενό στην αλυσίδα με νέο νουκλεοτίδιο. Ε) Η Lig3 βοηθά στην τελική συγκόλληση. ΣΤ) Ο μακρός BER ξεκινά όταν η βάση είναι απαμινωμένη, αλκυλιωμένη ή λάθος τοποθετημένη. Ζ) Η γλυκοζυλάση που λαμβάνει μέρος είναι μονο-λειτουργική και δεν διασπά επιπλέον το δεσμό μεταξύ δεοξυριβόζης και φωσφορικής ομάδας, όπως στο β). Η ελαττωματική βάση έχει απομακρυνθεί. Η) Η εκτομή της αλυσίδας ξεκινά με τις ενδονουκλεάσες-AP. Δημιουργείται ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αποτελείται από τις PCNA, FEN1, APE, PARP, Lig1, Polβ και Polδ ή Polε. Θ) Το σύμπλεγμα προχωρά με φορά 5'-3' εκτοπίζοντας 2 έως 8 νουκλεοτίδια, και συνθέτοντας ταυτόχρονα μέσω των πολυμερασών νέα νουκλεοτίδια, με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Ι) Όταν έχουν αντικατασταθεί τα νουκλεοτίδια έχει μείνει το παλιό ολιγονουκλεοτίδιο να εξέχει. Στο στάδιο αυτό το 5'-δεοξυριβοφωσφορικό άκρο εκτέμνεται από την ενδονουκλεάση-flap (FEN1). ΙΑ) Στο μακρό BER η Lig1 συγκollά την αλυσίδα, αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο PCNA.

### 2.2.2 *NER (Nucleotide excision repair- Μηχανισμός Εκτομής Νουκλεοτιδίου)*

Όταν οι βλάβες των βάσεων είναι πολλές, εντός μιας μικρής έκτασης, δηλαδή πυκνές, ο μηχανισμός εκτομής βάσης δεν είναι αρκετός και το κύτταρο λαμβάνει πιο δραστικά μέτρα, εκτέμνοντας ολόκληρα νουκλεοτίδια και αντικαθιστώντας τα με νέα, έχοντας ως οδηγό τη συμπληρωματικότητα των βάσεων. Οι βλάβες μπορεί να έχουν ως αιτία κάποια χημική ουσία, κάποια καρκινογόνα του περιβάλλοντος ή την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία του Ήλιου [56]. Ο NER είναι ένας ιδιαίτερος χρήσιμος μηχανισμός ο οποίος προστατεύει το κύτταρο από μεταλλάξεις που θα συνέβαιναν εάν παρέμεναν οι βλάβες χωρίς επιδιόρθωση. Ενδεικτικό της σπουδαιότητας του είναι ότι πολύ σοβαρές παθήσεις οφείλονται σε μεταλλάξεις όπου ο μηχανισμός αυτός υπολειτουργεί ή είναι ανενεργός. Τέτοιες νόσοι είναι η μελαγχρωματική ξηροδερμία, το σύνδρομο Cockayne και η τριχοθειοδυστροφία. Η μελαγχρωματική ξηροδερμία ξεκινά από την παιδική ηλικία με ανάπτυξη πολλών ευρυαγγείων, θηλωμάτων και κακοηθειών στο εκτιθέμενο στον ήλιο δέρμα ενώ πολύ συχνά αναπτύσσονται και μεταστατικοί κακοήθεις όγκοι. Το σύνδρομο Cockayne είναι μια σπάνια, θανατηφόρα νευροεκφυλιστική διαταραχή που συνοδεύεται με ελλειπή ανάπτυξη σώματος και νευρικού συστήματος, υπερβολική φωτοευαισθησία και πρόωρη γήρανση. Η τριχοθειοδυστροφία, η οποία επηρεάζει πολλά μέρη του σώματος, με χαρακτηριστικό σύμπτωμα τα εύθραυστα μαλλιά, από τα οποία λείπει θείο [57]. Και οι τρεις αναφερθείσες παθήσεις σχετίζονται με ευαισθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία [58]. Ο NER λοιπόν, που αναγνωρίζει σωρευμένες βλάβες βάσεων, αποκόπτει μια ολόκληρη αλλά μικρή μονόκλωνη αλληλουχία, αφήνοντας ένα χάσμα, το οποίο με τη σειρά τους γεμίζουν οι πολυμεράσες, αξιοποιώντας τη συμπληρωματικότητα των βάσεων από την αντικρινή αλυσίδα. Ο NER, όπως και ο BER, διαθέτει και αυτός δύο επιμέρους μονοπάτια, το πρώτο γνωστό ως transcription-coupled repair (TCR-NER) και το δεύτερο ως global genome repair (GGR-NER), τα οποία ενεργοποιούνται ανάλογα με τη θέση της βλάβης στο γονιδίωμα. Ο GGR-NER ανιχνεύει και επιδιορθώνει ζημιές σε ολόκληρο το γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένων και των μη μεταγραφεισών περιοχών και της σιωπηλής χρωματίνης, ενώ ο TCR-NER ενεργοποιείται μόνο όταν η βλάβη σε μία μεταγραφόμενη περιοχή περιορίζει τη δραστικότητα της μεταγραφής [59].

#### 2.2.2.1 *GGR-NER*

Το πρώτο βήμα κάθε μηχανισμού είναι η ανίχνευση της βλάβης. Στον GGR-NER το σύμπλεγμα XPC-hHR23B-XPE ελέγχει διαρκώς το γονιδίωμα για τυχόν σωρευμένες βλάβες βάσεων, και όταν βρει τέτοιες ξεκινά τον υπόλοιπο μηχανισμό. Στη συνέχεια,

αρχίζει το ξετύλιγμα της διπλής έλικας, ενώ ταυτόχρονα μέσω της πολυ-ουβικιτινίωσης επιτυγχάνεται η διάσπαση της ιστόνης 2A, ώστε να δοθεί πρόσβαση στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης [60].

Στο ξετύλιγμα της έλικας επιπλέον βοηθά το σύμπλεγμα TFIIH, που αποτελείται από δύο υπομονάδες. Ο πυρήνας του συμπλέγματος αποτελείται από πλήθος πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων και οι XPB, XPD, το υπόλοιπο σύμπλεγμα περιλαμβάνει τις CDK7, MNAT1 και CCNH. Το σύμπλεγμα αυτό έχει ιδιότητες ελικάσης, αμφίδρομα, δηλαδή και 3'-5' και 5'-3' χάρις στις XPB και XPD αντίστοιχα [61].

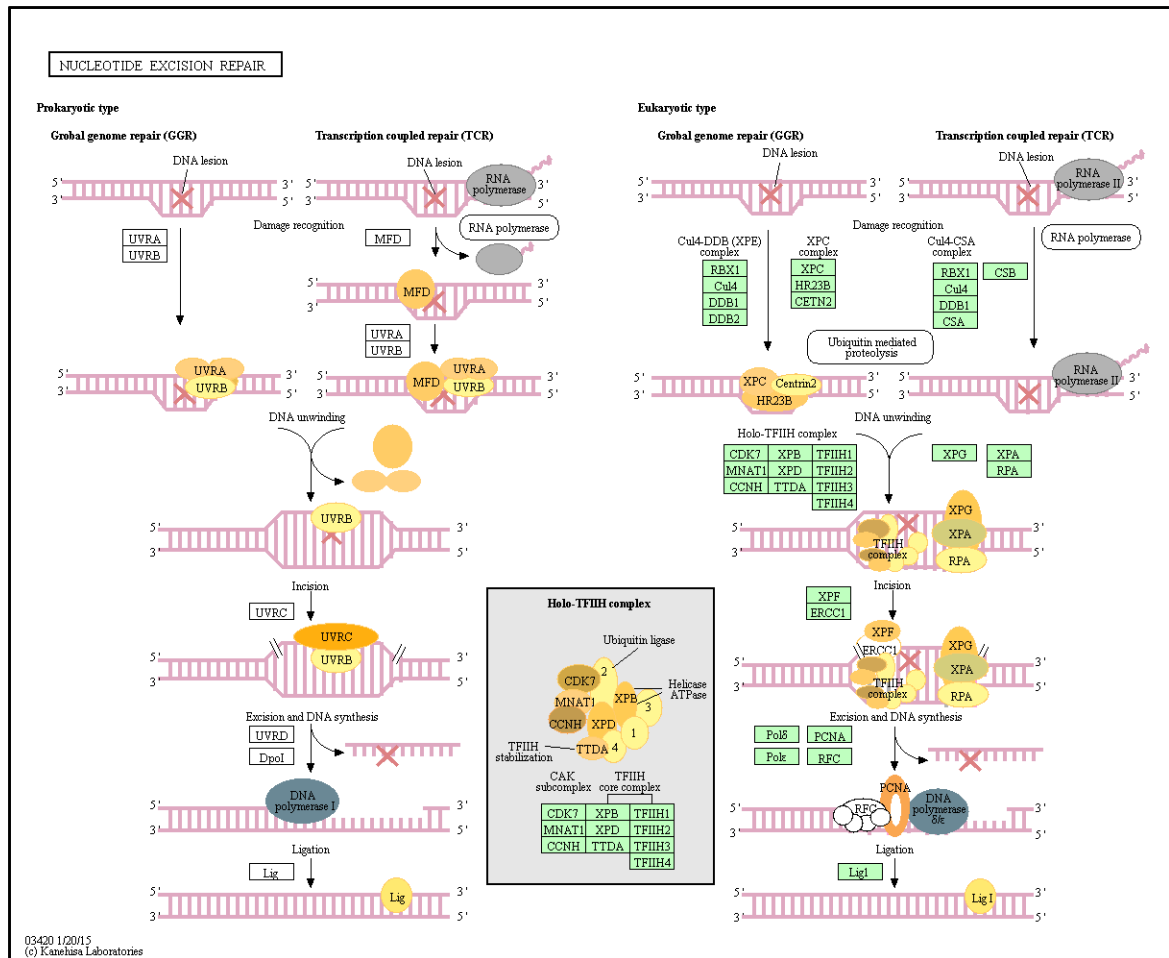
Η παρουσία των πρωτεϊνών XPG (γνωστή και ως ERCC5), RPA και XPG, συγκρατεί την ξετυλιγμένη έλικα, από το να επανέλθει στη φυσιολογική της συστροφή. Σχηματίζεται έτσι μία «φούσκα» γύρω από το τμήμα του DNA που φέρει τις βλάβες [62].

Η εκτομή ξεκινά με τις ERCC1 και ERCC4 (γνωστή και ως XPF, RAD1, FANCO) από το άκρο 5' όπου κάνουν την εκτομή 3' και με τις XPG, XPA και RPA από το 3' άκρο που κάνουν την εκτομή 5'. Η ταυτόχρονη εκτομή προς τις δύο κατευθύνσεις, οδηγεί στην απομάκρυνση ενός τμήματος μονόκλωνου DNA μήκους 25-30 νουκλεοτιδίων, αφήνοντας ένα ίσο χάσμα στη διπλή έλικα. Ο ρόλος της RPA είναι να προστατεύει τον ακέραιο κλώνο από την αποδόμηση που προκαλούν οι XPG.

Το σύμπλεγμα πρωτεϊνών RFC1-5 βοηθά στη σύνδεση της PCNA στο DNA. Η PCNA, όπως και στον BER, έτσι και στον NER λειτουργεί ως πλατφόρμα φόρτωσης των πολυμερασών, συντονίζοντας τη δράση τους. Οι πολυμεράσες (Polε/δ) συνθέτουν νέα νουκλεοτίδια αντιγράφοντας τον ακέραιο κλώνο. Τέλος η Lig 1 συγκολλά τα άκρα και η επιδιόρθωση έχει επιτευχθεί.

### 2.2.2.2 TCR-NER

Η μόνη διαφοροποίηση από τον GGR-NER έγκειται στην έναρξη του μηχανισμού, δηλαδή στην αναγνώριση της βλάβης. Η ανίχνευση ξεκινάει με την RNA πολυμέραση II (RNAP II) η οποία προσκολλάται στη θέση της βλάβης, στη συνέχεια η CSB αναγνωρίζει την ότι η RNAP II έχει κολλήσει σε αυτή τη θέση. Το σύμπλεγμα ουβικιτινής-λιγάσης (Cul4A-CSN-CSA) ενώνεται και αυτό με τις πρωτεΐνες που ήδη βρίσκονται στη θέση της βλάβης. Στη συνέχεια καταφθάνει το σύμπλεγμα TFIIH μαζί με την XPA, οπότε και αρχίζει το ξετύλιγμα της έλικας και ο μηχανισμός συνεχίζει όμοιος με τον GGR NER [63]



Σχήμα 2-3: Ο μηχανισμός NER. Διακρίνεται στον GGR και στον TCR. Οι δύο μηχανισμοί διαφέρουν στο αρχικό στάδιο της αναγνώρισης της βλάβης. Ο TCR ενεργοποιείται μόνο κατά τη μεταγραφή του DNA, εφόσον οι βλάβες καθυστερούν τη διαδικασία αυτή. Αρχικά γίνεται η αναγνώριση, στη συνέχεια υφίσταται ουβικιτινίωση των ιστονών, για να διασπαστούν και να φύγουν και να γίνει προσβάσιμο το DNA στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης. Η αναγνώριση της βλάβης στο μεν GGR γίνεται από τα συμπλέγματα Cul4-XPE και XPC, ενώ στον TCR από την RNAP II και το σύμπλεγμα Cul4-CSA. Κατόπιν οι μηχανισμοί ταυτίζονται, και σειρά έχει το ξετόλιγμα της διπλής έλικας. Στη λειτουργία αυτή βοηθά και το σύμπλεγμα TFIIH, το οποίο εικονίζεται στο ένθετο και αποτελείται και εκείνο από δύο υπομονάδες. Οι πρωτεΐνες XPG, XPA και RPA κρατούν τη διπλή έλικα ξεδιπλωμένη. Στο επόμενο στάδιο ξεκινά ταυτόχρονα η εκτομή των νουκλεοτιδίων και από τις δύο μεριές. Την εκτομή κάνουν οι XPF και XPG. Ο ρόλος της RPA είναι να προστατεύει τον ακέραιο κλώνο. Ο ελαττωματικός κλώνος απομακρύνεται και με τις RPF και PCNA που συγκρατούν τις πολυμεράσες επιτοχάνεται η σύνθεση νέων νουκλεοτιδίων με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Η διαδικασία τελειώνει με την Lig1 η οποία συγκollά τα άκρα.

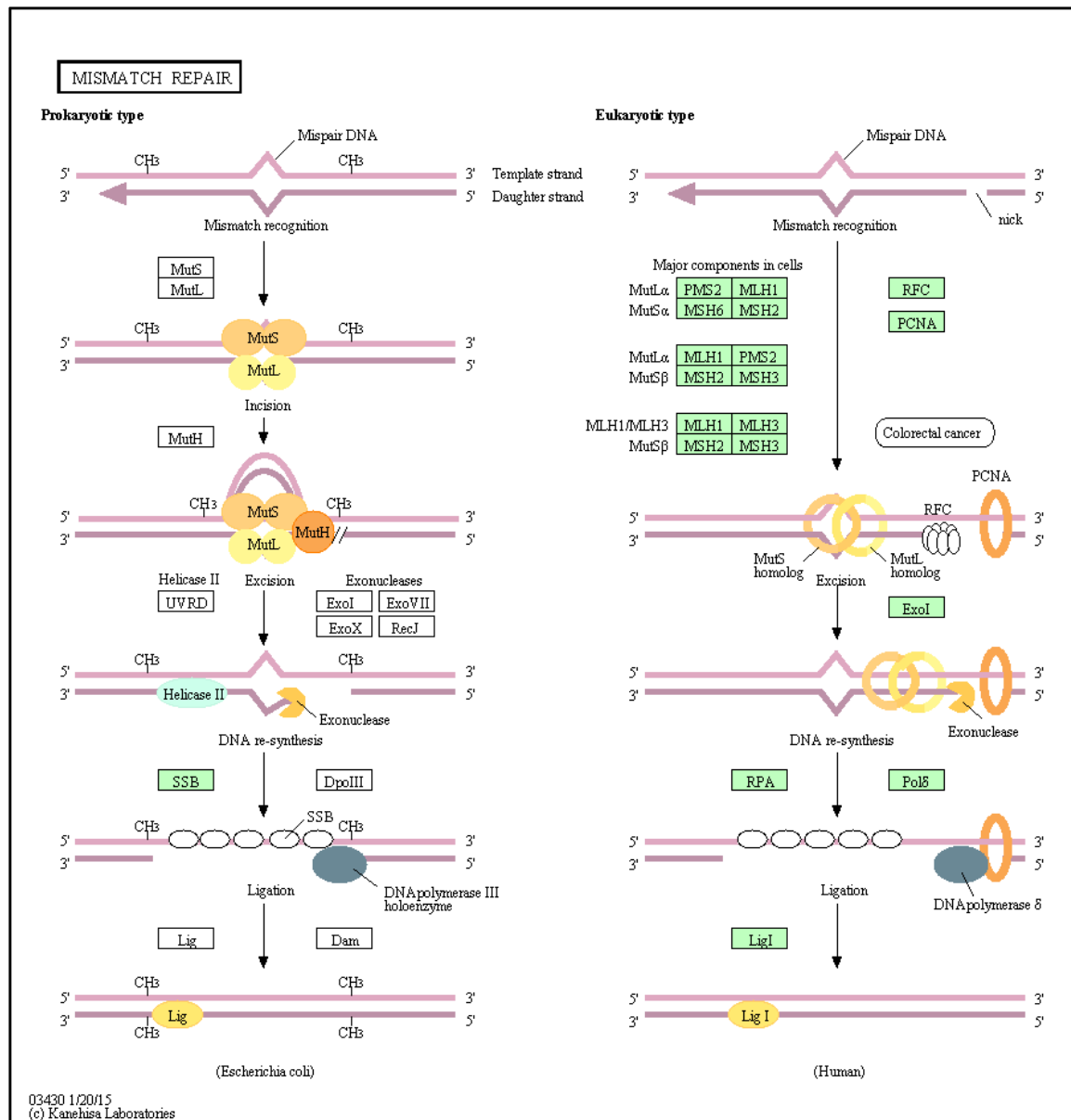
### 2.2.3 MMR (Mismatch Repair - Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας)

Ο Μηχανισμός Επιδιόρθωσης Αναντιστοιχίας είναι υπεύθυνος για λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Αντικαθιστά νουκλεοτίδια που είναι τοποθετημένα αναντίστοιχα, είτε αφαιρεί άλλα που είναι πλεονάζοντα, είτε προσθέτει νουκλεοτίδια που έχουν παραλειφθεί. Για τη διασφάλιση ότι δε θα γίνουν τέτοιου είδους λάθη υπεύθυνες είναι οι DNA πολυμεράσες, ωστόσο όμως συμβαίνουν και τότε ενεργοποιείται ο μηχανισμός αυτός [64].

Ο Μηχανισμός Επιδιόρθωσης Αναντιστοιχίας είναι αρχέγονος και έχει διατηρηθεί σχεδόν πανομοιότυπος κατά την εξελικτική διαδικασία. Έχει μελετηθεί επισοταμένως στην *E. coli* και η μελέτη για τον άνθρωπο έχει επιτευχθεί κυρίως χάρις στην ομολογία των γονιδίων που τον επιτελούν [65].

Τα τυχόν λάθη κατά την αντιγραφή, όπως είναι λογικό συμβαίνουν στον νέο-συντεθέντα κλώνο. Για την ανίχνευση λοιπόν, δεν αρκεί να διαβάσει ο μηχανισμός την ύπαρξη ενός αταίριαστού ζεύγους βάσεων, αλλά χρειάζεται και να μπορεί να ξεχωρίσει τον νεοσυντεθέντα (θυγατρικό) κλώνο από τον αρχικό (μητρικό), ώστε να αντικατασταθεί η νέα βάση και όχι να κατοχυρωθεί το λάθος αλλάζοντας τη σωστή που βρίσκεται στο μητρικό κλώνο. Ο μηχανισμός αναγνώρισης του θυγατρικού κλώνου δεν είναι απολύτως εξακριβωμένος, αλλά εικάζεται ότι οι διακοπές που εμφανίζονται προσωρινά, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, ακριβώς για το λόγο ότι η αντιγραφή άρχεται από πολλές αφετηρίες ταυτόχρονα, οι διακοπές λοιπόν που πρόκειται αργότερα να συμπληρωθούν από τη λιγάση, είναι εκείνες που κάνουν τον νέο κλώνο αναγνωρίσιμο.

Η διαδικασία ξεκινά με την πρόσδεση δίπλα στο χάσμα τής RFC και της PCNA. Η αναγνώριση γίνεται μέσω της MutS, όπου στα θηλαστικά διαθέτει πέντε ομόλογες τις MSH2-6, από τις οποίες στον MMR μπορεί να συμμετέχουν οι MSH2, MSH3 και MSH6. Οι αναντιστοιχίες και οι μικρής έκτασης παραλείψεις ή επιπλέον προσθήκες αναγνωρίζονται από το ετεροδιμερές MutS $\alpha$ , το οποίο αποτελείται από τις MSH2 και MSH6. Μεγάλης έκτασης παραλείψεις ή επιπλέον προσθήκες αναγνωρίζονται από το ετεροδιμερές MutS $\beta$ , το οποίο αποτελούν οι MSH2 και MSH3 [66].



Σχήμα 2-4: MMR- Επιδιόρθωση αναντιστοιχίας: Από κάποιο χάσμα στο θυγατρικό κλώνο ξεκινά ο έλεγχος για αναντιστοιχίες βάσεων, παραλείψεις ή επιπλέον προσθήκες κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Αρχικά προσδένονται οι RFC και PCNA, και τότε το ετεροδιμερές MutS ξεκινά να ψάχνει για λάθη. Όταν εντοπιστεί το λάθος προσδένεται και η MutLa, η οποία επιφέρει δύο τομές, στο θυγατρικό κλώνο, εκατέρωθεν του σφάλματος. Η ExoI αρχίζει να κόβει τα νουκλεοτίδια, μεταξύ των οποίων βρίσκεται και η περιοχή του σφάλματος. Ταυτόχρονα η RPA προστατεύει το μητρικό κλώνο, από τη δράση της ExoI ή κάποιας ενδονουκλεάσης. Όταν έχει πια απομακρυνθεί το τμήμα του θυγατρικού κλώνου που καθορίστηκε από τις τομές, η DNA Polδ συνθέτει νέα νουκλεοτίδια, και η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη συγκολλητική δράση της LigI. [65]

Η πρόσδεση της MutS προκαλεί μία απότομη συστροφή στη διπλή έλικα. Στη συνέχεια προσδένεται και η MutL, ενεργοποιώντας μια αλυσίδα από συμβάντα που θα επιτελέσουν την επιδιόρθωση. Η MutLa προκαλεί δύο εκτομές στο θυγατρικό κλώνο οι οποίες

περιέχουν τη λανθασμένη έκταση. Η ExoI αναλαμβάνει την εκτομή όλων των νουκλεοτιδίων που περιέχονται μεταξύ των δύο εκτομών του θυγατρικού κλώνου. Η RPA προστατεύει τον εναπομείναντα μητρικό κλώνο από αχρείαση επίθεση από ενδονουκλεάσες και από την ExoI, όσο εκείνη εκτέμνει το θυγατρικό κλώνο [67]. Η Polδ συνθέτει νέα νουκλεοτίδια, και τέλος η LigI συγκολλά την νέα αλληλουχία του θυγατρικού κλώνου, η οποία δεν περιέχει πλέον λάθη.

#### 2.2.4 HR (Homologous recombination-Ομόλογος Ανασυνδυασμός)

Ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός επιδιορθώνει δίκλωνες θραύσεις στο DNA αλλά και συμβάλλει στη διαδικασία της Μείωσης κατά την οποία παράγονται τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια. Κατά τον Ομόλογο Ανασυνδυασμό ανταλλάσσονται αλληλουχίες νουκλεοτιδίων μεταξύ δύο παρόμοιων ή και ταυτόσημων μορίων DNA. Πρόκειται για ένα πολύ αξιόπιστο μηχανισμό, μετά το πέρας του οποίου δεν υπάρχουν λάθη, σε αντίθεση με τον NHEJ, ο οποίος δεν εξασφαλίζει την αξιόπιστη επιδιόρθωση, αλλά χρησιμοποιείται από τα κύτταρα ως λύση ανάγκης. Ο μηχανισμός αυτός θα περίμενε κανείς να είναι μονόδρομος για το κύτταρο, δεδομένου ότι είναι απολύτως αξιόπιστος, όμως για να ενεργοποιηθεί απαιτείται να υπάρχει ένα ακέραιο αντίγραφο, σύμφωνα με το οποίο θα γίνει η ακριβής σύνθεση των νουκλεοτιδίων που θα αντικατασταθούν. Το αντίγραφο όμως αυτό, δηλαδή η αδελφή χρωματίδη, είναι διαθέσιμο μόνο κατά την ύστερη φάση της Σύνθεσης και κατά τη διάρκεια της G2.

Ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός είναι μακράν ο πολυπλοκότερος από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης καθώς εμπλέκει παράγωγα από περίπου 162 γονίδια ενώ οι υπόλοιποι μηχανισμοί έχουν: 52 ο BER, 124 ο NER, 43 ο MMR και 73 ο NHEJ<sup>4</sup>.

Η αναγνώριση της Δίκλωνης θραύσης προηγείται της ενάρξεως του μηχανισμού, και συμβατικά δεν περιλαμβάνεται στην περιγραφή του, καθώς ο HR δεν είναι ο μόνος μηχανισμός που ανταποκρίνεται στην ύπαρξη της δίκλωνης θραύσης. Η αναγνώριση λοιπόν επιτυγχάνεται, μέσω του συμπλόκου MRN και της ATM, που προκαλούν τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX, αφήνοντάς τη στη φωσφορυλιωμένη της μορφή που συμβολίζεται ως γ-H2AX [68].

Η έναρξη του Ομόλογου Ανασυνδυασμού περιλαμβάνει την επιστράτευση του συμπλόκου MRN και της διμερισμένης νουκλεάσης CtIP [69], η CtIP υφίσταται

---

<sup>4</sup> Στο Παράρτημα-B1 της διατριβής παρουσιάζονται αυτά τα γονίδια σε μορφή πίνακα.



ουβικουϊτινίωση από το σύμπλοκο BRCA1-BARD1. Για να ξεκινήσει η εκτομή των νουκλεοτιδίων χρειάζεται πρώτα να συμβεί η αποακετυλίωση της CtIP από την SIRT6 και να δράσουν οι νουκλεάσες Artemis και MRE11. Δύο σύμπλοκα, που περιλαμβάνουν την ελικάση BLM σε εξαμερή μορφή, εκτελούν εκτεταμένη εκτομή των άκρων που έχει δημιουργήσει η θραύση. Σε συνέργεια με την Exo1, η BLM προάγει την εκτομή, ανεξάρτητα από τη δράση της ως ελικάση. Εναλλακτικά, σε συνέργεια με την DNA2, η BLM προάγει την εκτομή ξετυλίγοντας το δίκλωνο DNA (dsDNA). Καθώς προχωράει η εκτομή των νουκλεοτιδίων, στα μονόκλωνα 3'-άκρα που δημιουργούνται προσδένονται ετεροδιμερή της RPA (RPA70-RPA32-RPA14), προστατεύοντάς τα από περεταίρω (αχρείαστη) δράση ενδονουκλεασών ή εξωνουκλεασών. Η αποφωσφορυλίωση της RPA προάγει την πρόσδεσή της στο DNA. (39) Η ενεργοποίηση της κινάσης ATR και δευτερευόντως της Chk1 εξαρτάται από την πρόσδεση του ATR-ATRIP στις μονόκλωνες περιοχές που είναι καλυμμένες με μόρια RPA και από την πρόσδεση του συμπλέγματος-τοιμπίδα 9-1-1 στον 5' πρωταρχικό κόμβο του εκτετμημένου DNA. Το φωσφορυλιωμένο σύμπλεγμα 9-1-1 φορτώνεται από το σύμπλεγμα RAD17-RFC2-5, ενώ η φωσφορυλιωμένη TopBP1 δρα ως γέφυρα για την ενεργοποίηση της ATR. Η συμμετοχή το RHINO είναι η πρόσδεσή του τόσο στο 9-1-1, όσο και στην TopBP1. (40) Η πρωτεάση SENP αφαιρεί τα επιπλέον αμινοξέα από την πρόδρομη μορφή της SUMO και έτσι την ενεργοποιεί. Η SUMO με τη σειρά της τροποποιεί την RPA σε RPA70 με μια διαδικασία παρόμοια με την ουβικουϊτινίωση που ονομάζεται SUMOylation. Η επίδραση επομένως της SENP δρα στην αύξηση της πρόσδεσης της RAD51 στην RPA70. Η BRCA1 προσκαλεί την PALB2. (41) Η BRCA1 διευκολύνει την επιστράτευση της BRCA2 μέσω της πρωτεΐνης-γέφυρα PALB2. Το σύμπλοκο αναδιάταξης χρωματινής (chromatin-remodeling) NuA4, του οποίου η υπομονάδα MRG15 αλληλεπιδρά με την PALB2, ενδεχομένως να συμβάλλει και αυτό στην επιστράτευση της PALB2. Η BRIT1 επιστρατεύει την BRCA2, η οποία φέρνει μόρια RAD51 στην περιοχή της επιδιόρθωσης. Η φωσφορυλίωση της RAD51 από την c-ABL οδηγεί τη φόρτωση της RAD51 στο μονόκλωνο DNA. (42) Η BRCA2 είναι ο βασικός μεσολαβητής για το σχηματισμό νήματος νουκλεοπρωτεΐνης που περιέχει RAD51, κατά τον οποίο απομακρύνονται τα μόρια της RPA, και ο σχηματισμός του νήματος ρυθμίζεται από επιπλέον πρωτεΐνες όπως η DDS1 και BCCIP $\alpha/\beta$ . Για το σχηματισμό του νήματος RAD51-νουκλεοπρωτεΐνης απαιτούνται τα πέντε παράλογα της RAD51, τα XRCC2/3, RAD51B/C/D και η SWS1, η οποία αλληλεπιδρά με την RAD51D. Η RAD18 εμπλέκεται στην επιδιόρθωση μέσω της αλληλεπίδρασής της με την RAD51C. (43) Η ανάπτυξη και η ολοκλήρωση του νήματος RAD51-νουκλεοπρωτεΐνης επηρεάζεται από τη συνεργατική

δράση των BRC-επαναλήψεων της BRCA2, τα οποία βεβαιώνουν ότι η RAD51 φορτώνεται επιλεκτικά στο μονόκλωνο DNA και ότι απομακρύνονται τα μόρια της RPA [70].

#### 2.2.4.1 *Break induced replication*

Μία πιθανή εκδοχή του Ομόλογου Ανασυνδυασμού μπορεί να περιλαμβάνει το σχηματισμό νήματος RAD51-νουκλεοπρωτεΐνης μόνο στο ένα εκτεταμένο άκρο. (44) Το νήμα RAD51 ψάχνει και ζευγαρώνει με μια ομόλογη αλληλουχία στη γειτονική αδελφή χρωματίδη, κατά τη φάση S ή την G2. Η RAD54 με την ιδιότητα της κινητήριας ΑΤΡάσης διευκολύνει τη διαδικασία [71]. Δημιουργείται ένας βρόχος σχήματος 'D' μέσω της συνεργασίας της PALB2 και της RAD51AP1 καθώς σχηματίζεται το ετεροδιπλό DNA<sup>5</sup>. Οι τελευταίες δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, με το DNA αλλά και με τη RAD51.

#### 2.2.4.2 *SDSA-Synthesis Depended Strand annealing*

Το ετεροδιπλό μόριο επιμηκώνεται με σύνθεση επιδιόρθωσης. Σε αυτό το στάδιο μπορεί να εμπλέκεται κάποια χαμηλής πιστότητας πολυμεράση, όπως η πολυμεράση μετάφρασης Polζ-REV1. (46) Στο επιμέρους μονοπάτι SDSA η διάσπαση του ετεροδιπλού τμήματος διενεργείται με την απελευθέρωση του εισβάλλοντα κλώνου, με τη βοήθεια της RAD54, και την επανασύνδεση με το δεύτερο άκρο. (47) Το στάδιο αυτό της επανασύνδεσης πιθανώς να υποβοηθείται από την RAD52 ή άλλους παράγοντες. Μετά την ανασύνδεση της ομόλογης περιοχής, τυχόν υπερθέσεις που πιθανώς προκύπτουν από την επιπλέον αχρείαση σύνθεση, απομακρύνονται από μια εξειδικευμένη σε κόμβους νουκλεάση (junction-specific nuclease) όπως η ERCC1-XRF. (48) Ένα επιπλέον στάδιο σύνθεσης συμπληρώνει τα εναπομείναντα μονόκλινα χάσματα. Το σύμπλοκο πολυμερασών μετάφρασης Polζ-REV1 πιθανώς να εμπλέκεται σε αυτή τη δεύτερη σύνθεση. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η γονιδιακή μετατροπή<sup>6</sup>, όπου η ακέραιη χρωματίδη παρέχει την πληροφορία για την επιδιόρθωση της δίκλωνης θραύσης. (49) Οι εναπομείνουσες μετά τη σύνθεση μονόκλωνες διαλείψεις εξαλείφονται από τη δράση των λιγασών LIG3 ή LIG1, τις οποίες συναντήσαμε και στους BER και NER.

---

<sup>5</sup> **Ετεροδιπλό DNA:** ένα δίκλωνο μόριο νουκλεϊνικού οξέος, προερχόμενο από γενετικό ανασυνδυασμό, όπου ο κάθε κλώνος προέρχεται από διαφορετικές πηγές, όπως τα διαφορετικά ομόλογα χρωμοσώματα ή ακόμη και από διαφορετικούς οργανισμούς Wikipedia contributors [72].

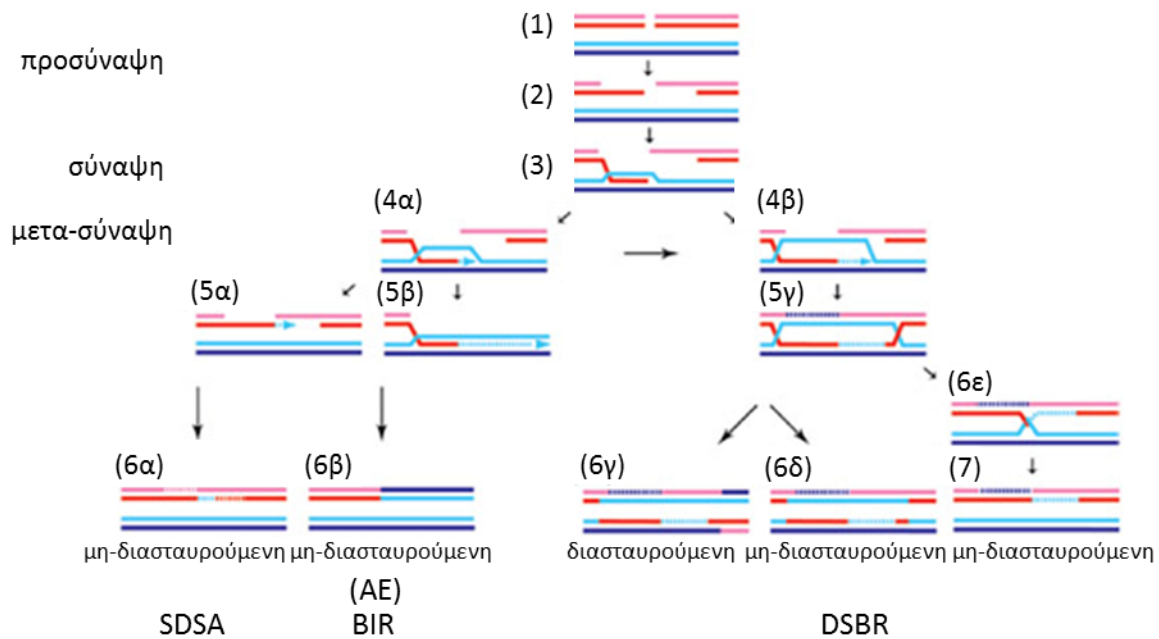
<sup>6</sup> **Γονιδιακή μετατροπή:** η διαδικασία με την οποία μία αλληλουχία DNA αντικαθιστά μία ομόλογη αλληλουχία, με αποτέλεσμα οι δυο αλληλουχίες να γίνονται πανομοιότυπες μετά από αυτήν [73].

### 2.2.4.3 *Crossing over via cleavage of nicked joint molecules*

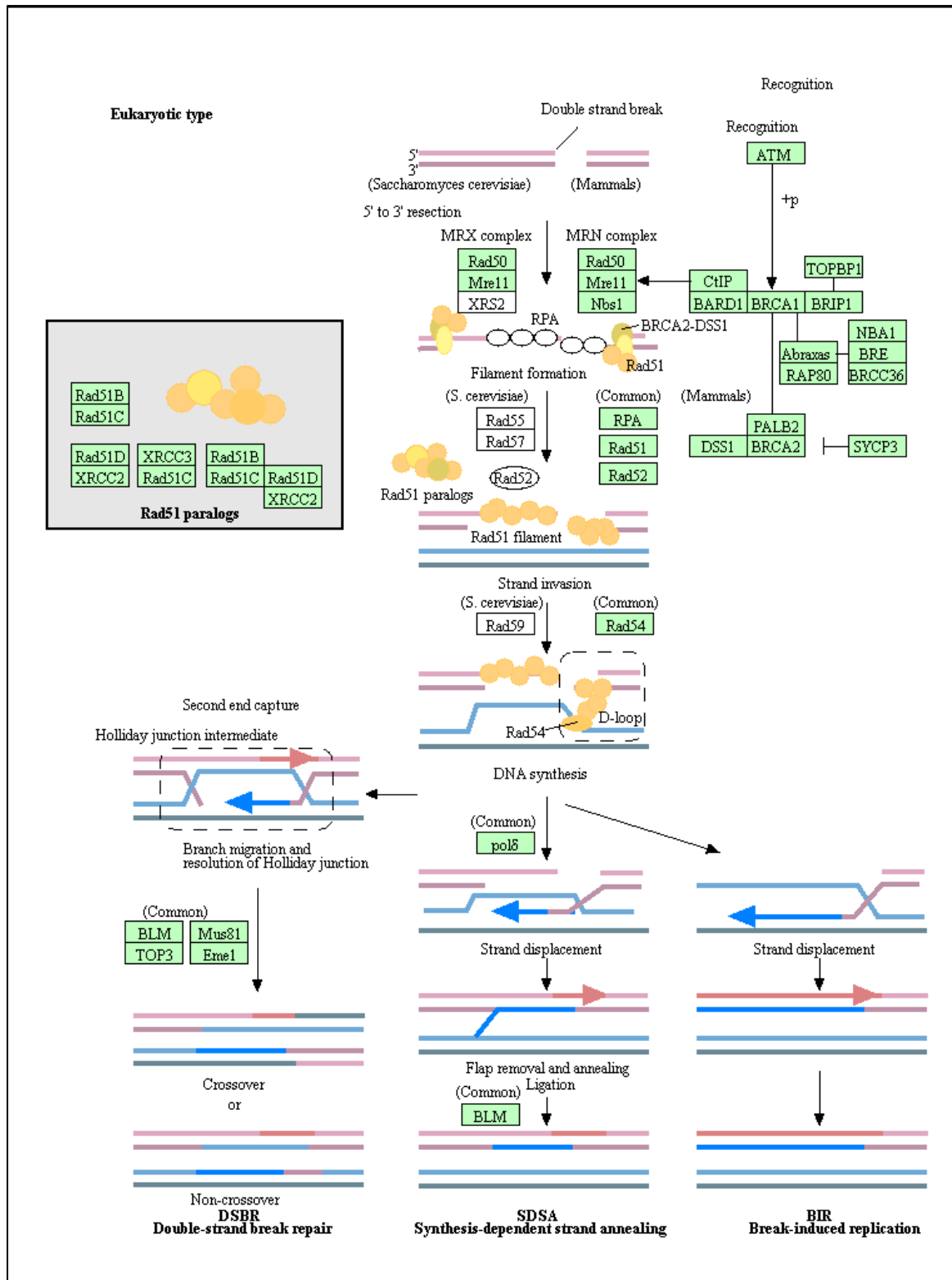
(50) Το εκτετμημένο δεύτερο άκρο δεσμεύεται από το βρόχο σχήματος-D. Σε αυτό ενδεχομένως να μεσολαβεί με την ιδιότητα ανασύνδεσής της η RAD52. (51) Η επιδιορθωτική σύνθεση συμβαίνει και στις δύο πλευρές του βρόχου-D, πιθανώς μέσω της πολυμεράσης Polζ-REV1. Η προκύπτουσα δομή είναι ουσιαστικά δύο κόμβοι-Holliday<sup>7</sup> με εγκοπές. (52) Για να λυθούν οι κόμβοι Holliday εξειδικευμένες νουκλεάσες προκαλούν δυο επιπλέον εγκοπές. Τέτοιες νουκλεάσες μπορεί να είναι οι GEN1, SLX1-SLX4 και MUS81-EME1. Στο σχήμα οι νουκλεάσες αυτές παριστώνται ως κόκκινα βέλη. (53) Οι εγκοπές ενώνονται σε συνδυασμούς όπως απεικονίζονται στο σχήμα με τα μπλε και κόκκινα βέλη. (54) Οι προκύπτουσες αλυσίδες της διασταύρωσης είναι αποτέλεσμα ανταλλαγής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. (55) Η επαναφορά της δομής της χρωματινής συμβαίνει μέσω της δράσης συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματινής και την αναστροφή πληθώρας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η αναλυτική παρουσίαση που προηγήθηκε βασίστηκε στην επισκόπηση του Larry H. Thompson [75] και η εκτενής της αναφορά στην παρούσα διατριβή ήταν η αναλυτική περιγραφή σε βιοχημικό επίπεδο των μηχανισμών. Ψάχνοντας τη βιβλιογραφία για τον Ομόλογο Ανασυνδυασμό, διαπιστώθηκε ότι τα επιμέρους μονοπάτια περιγράφονται με διαφορετικούς τρόπους από τους διάφορους συγγραφείς. Παρουσιάζεται εδώ και εξηγείται ένα σχήμα (**Σχήμα 2-5**) από την επισκόπηση των Li and Heyer [76], η οποία επιλέχθηκε μεταξύ των άλλων ως η πιο περιγραφική όσον αφορά τους πιθανούς συνδυασμούς αποτελεσμάτων που μπορεί να έχει στις εμπλεκόμενες αλυσίδες του DNA ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός.

---

<sup>7</sup> **Κόμβος του Holliday:** μια διασταυρούμενη δομή, προκύπτουσα κατά το γενετικό ανασυνδυασμό. Όταν δύο δίκλινα μόρια DNA διαχωρίζονται σε 4 κλώνους με σκοπό να ανταλλάξουν γενετική πληροφορία. Η δομή αυτή προτάθηκε από το γενετιστή Robin Holliday το 1964 [74].



Σχήμα 2-5: Πιθανά αποτελέσματα στις αλυσίδες (εκμαγείο και επιδιορθωμένη) μετά από Ομόλογο Ανασυνδυασμό: Ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: την προ-σύναψη, τη σύναψη και τη μετα-σύναψη. Κατά την προ-σύναψη αναγνωρίζονται τα άκρα που έχουν δημιουργηθεί από τη Δίκλωνη Θραύση και τροποποιούνται ώστε να γίνουν μονόκλωνες ουρές 3'-OH (στάδια 1-2). Κατά τη σύναψη δημιουργείται ένας βρόχος σχήματος D από τον εισβάλλοντα κλώνο στην αλυσίδα εκμαγείο (στάδιο 3). Διακρίνονται τουλάχιστον τρία μονοπάτια: Κατά την ανασύνδεση την εξαρτώμενη από τη σύνθεση (*synthesis-dependent strand annealing-SDSA*, στάδια 4α-5α-6α) ο εισβάλλον κλώνος αποσυνδέεται όταν τελειώσει η σύνθεση και συγκολλάται με το δεύτερο άκρο, ενώ προκαλείται μια εντοπισμένη μόνο γονιδιακή μετατροπή. Σε αυτή τη διαδικασία ενδέχεται να εμπλέκονται πολλοί κύκλοι εισβολής, σύνθεσης και αποσύνδεσης. Στην Αντιγραφή λόγω Θραύσης (*break-induced replication-BIR*, στάδια 4α-5β-6β) ο βρόχος-D μετασχηματίζεται σε μια πλήρη διχάλα αντιγραφής αντιγράφοντας ολόκληρο το υπόλοιπο χρωμόσωμα, οδηγώντας έτσι σε απώλεια ετεροζυγωτίας (AE). Στην Επιδιόρθωση Δίκλωνων Θραύσεων- ΕΔΘ (στάδια 4β-5γ-6γ-ε-7) εμπλέκονται και τα δύο άκρα που έχει δημιουργήσει η θραύση είτε με ανεξάρτητη εισβολή και των δύο κλώνων είτε με την πρόσληψη (*capture*) του δεύτερου άκρου, δημιουργώντας ένα διπλό κόμβο του *Holliday*. Ο κόμβος στη συνέχεια μπορεί είτε να λυθεί από μια διαλυτάση σε διασταυρούμενα ή μη- προϊόντα (στάδια 6γ-δ) ή μπορεί να λυθεί μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την BLM-γαιτνίαση κλώνων και την αποδέσμευση μέσω της TOPOIIIα (στάδιο 6ε), οδηγώντας αποκλειστικώς σε μη-διασταυρούμενα προϊόντα (στάδιο 7). (πηγή εικόνας: Li and Heyer, 2008 [76])



Σχήμα 2-6: Ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός έχει τρεις πιθανές εκβάσεις.

### 2.2.5 NHEJ (Non-Homologous End Joining-Μη Ομόλογη Ένωση Ακρων)

Η περιγραφή που ακολουθεί του μηχανισμού NHEJ, όπως και στην προηγούμενη παράγραφο προϋποθέτει ότι έχει γίνει η αναγνώριση από τους κοτταρικούς μηχανισμούς

της ύπαρξης της δίκλωνης θραύσης και έχει ληφθεί η απόφαση για την επιλογή του μηχανισμού επιδιόρθωσης.

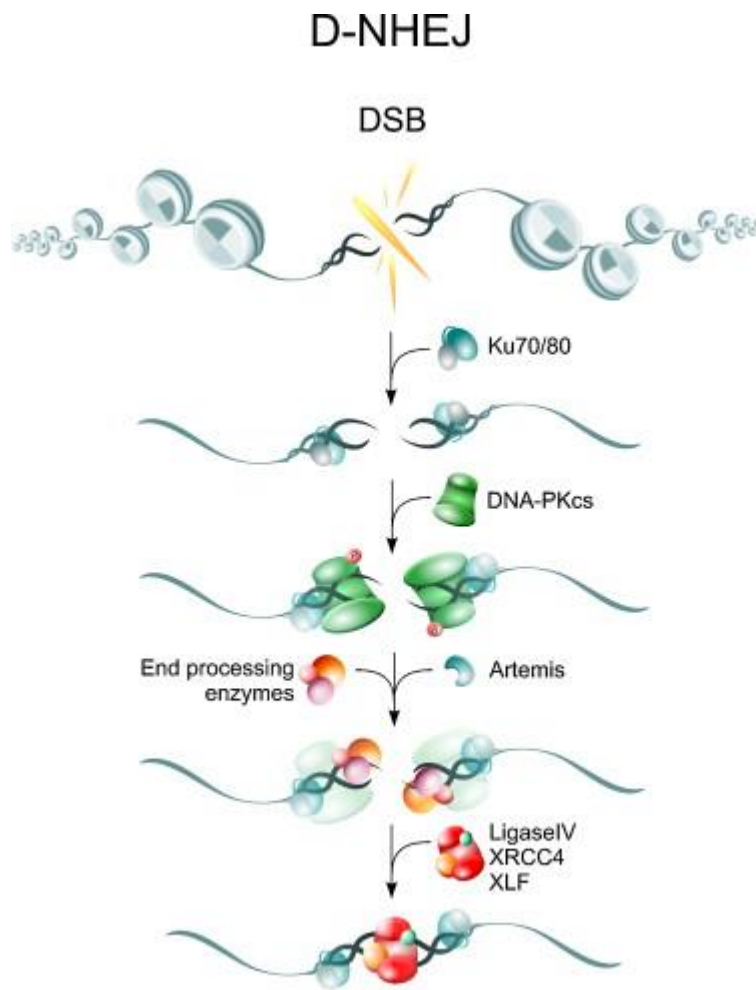
Ο μηχανισμός αυτός συνοπτικά περιγράφεται ως την άμεση ένωση των κομμένων άκρων. Μια απλή συγκόλληση των άκρων που προκάλεσε η θραύση. Ο μηχανισμός αυτός είναι γρήγορος και εύκολος, δεν απαιτεί την ύπαρξη ομόλογης αλληλουχίας για να λειτουργήσει ως εκμαγείο, αλλά εγκυμονεί την πιθανότητα λαθών, καθώς εάν έχουν χαθεί νουκλεοτίδια κατά τη θραύση, τότε και ειδικά αν αυτά που λείπουν δεν είναι πολλαπλάσια του 3, θα προκύψει κατά τη μετάφραση λάθος που θα αφορά ολόκληρο γονίδιο. Θυμίζουμε εδώ ότι για τη μεταγραφή του DNA σε RNA και την επακόλουθη μετάφραση σε αμινοξέα ακολουθείται ο κανόνας τις τριπλέτας, δηλαδή τρία νουκλεοτίδια κωδικοποιούν ένα αμινοξύ. Επιπλέον η ανάγνωση του γονιδίου είναι γραμμική, δηλαδή συνεχής. Επομένως εάν χαθεί έστω ένα νουκλεοτίδιο, τότε δε θα γίνει λάθος μόνο σε ένα αμινοξύ, αλλά το λάθος θα μεταφέρεται σε κάθε επόμενο αμινοξύ που θα κωδικοποιεί η αλληλουχία. Εάν πάλι χαθούν τρία νουκλεοτίδια τότε θα χαθούν ένα έως δύο αμινοξέα, ζημιά πολύ μικρότερη από το να αλλάξει μεγάλο τμήμα της κωδικοποίησης. Η Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων όχι μόνο δεν εγγυάται την ακεραιότητα του επιδιορθούμενου μορίου, αλλά δεν είναι και σε θέση να ελέγξει εάν τα δύο άκρα που συγκολλά είναι προϊόντα της ίδιας θραύσης!

Ο NHEJ συμβαίνει λοιπόν με αντίδραση σύνδεσης και ως εκ τούτου απαιτεί συνδέσιμα άκρα. Για το λόγο ότι οι δίκλωνες θραύσεις, οι επαγόμενες από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, συνήθως συνοδεύονται με βλάβη στο σακχαροφωσφορικό σκελετό του DNA ή και με βλάβες στις βάσεις που είναι κοντά στα άκρα της θραύσης, προϋπόθεση για τη σύνδεση είναι η απομάκρυνση αυτών των βλαβών. Έτσι παρατηρείται ότι η επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων με τον NHEJ συνοδεύεται και από περιορισμένες ή και εκτεταμένες προσθήκες ή διαγραφές νουκλεοτιδίων, οι οποίες αλλάζουν την αλληλουχία του επιδιορθούμενου μορίου [30].

#### **2.2.5.1 Κλασική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων Canonical NHEJ**

Η πρωτεΐνη Ku, η οποία είναι εκείνη που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αφθονία στα κύτταρα, εκδηλώνει πολύ υψηλή προσδεσιμότητα στα άκρα του DNA κι έτσι προσδεδεμένη εκκινεί το μηχανισμό. Η Ku είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από τις υπομονάδες Ku70/Ku80 η οποία μόλις προσδεθεί στα άκρα του DNA προσελκύει την καταλυτική υπομονάδα της DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) ώστε να σχηματιστεί το ενεργό ολοένζυμο DNA-PK. Ο σχηματισμός αυτού του ενεργού

συμπλόκου κινασών επιφέρει φωσφορυλίωση σε άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό, όπως τις RPA2, WRN, XLF/Cernunnos, DNA Ligase IV (LigIV) και XRCC4,



Restores DNA integrity. Sequence deviation likely

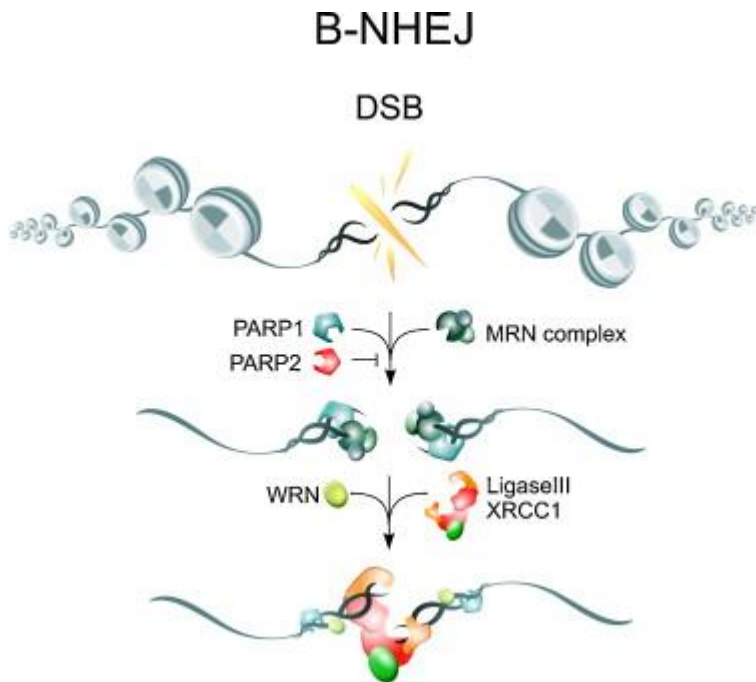
Σχήμα 2-7: Κλασική Μη Ομόλογη Σύνδεση Άκρων: η πρόσδεση του ετεροδιμερούς Ku70/80 στα άκρα της θραύσης διευκολύνει την επιστράτευση της DNA-PKcs, μιας σημαντικής κινάσης που ενεργοποιείται από την ύπαρξη DNA άκρων και συνεισφέρει στην αποτελεσματικότητα του παρόντος μηχανισμού. Η DNA-PKcs προάγει την επεξεργασία άκρων με τη νουκλεάση Artemis και την επακόλουθη επανένωση των σπασμένων άκρων του DNA με το σύμπλοκο LigIV/XRCC4/XLF [30].

όπως επίσης και την αυτοφωσφορυλίωση της DNA-PKcs. Η τελευταία, επιπλέον, προσδένεται στην πρωτεΐνη Artemis, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητά της. Η Artemis είναι μια ενδονουκλεάση για την οποία εικάζεται ότι εμπλέκεται στην επεξεργασία των άκρων του DNA που συμβαίνει πριν από τη σύνδεση, ιδιαίτερα όταν τα άκρα περιέχουν σύνθετες βλάβες.

Η αυτοφωσφορυλίωση της DNA-PKcs παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για τη μετάβαση του ολοενζύμου από την ανοιχτή στην κλειστή του μορφή. Η κλειστή μορφή του ολοενζύμου επιτρέπει την επεξεργασία των άκρων του DNA από την πολυνουκλεοτιδική κινάση PNK και την τρανσφεράση

TDT, τον πολυμερισμό από τις DNA πολυμεράσες λ και μ και τελικώς τη σύνδεση από το σύμπλοκο LigIV/XRCC4/XLF. Μέσω της συντονισμένης δράσης των συμπλόκων LigIV/XRCC4/XLF και DNA-PK τα δύο διαθέσιμα άκρα του DNA συγκολλώνται. Εάν τα δύο αυτά άκρα προέρχονται από την ίδια θραύση τότε αποκαθίσταται η ακεραιότητα του μορίου DNA [30].

### 2.2.5.2 Εφεδρική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων Backup NHEJ



Σχήμα 2-8: Εφεδρική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων: Σε αυτό το μονοπάτι το ρόλο της LigIV αναλαμβάνει η LigIII, η οποία ρυθμίζεται από την PARP1, ενώ δημιουργεί ένα σύμπλοκο με την XRCC1 [30].

κάπως πιο αργούς ρυθμούς [77]. Αντίστοιχα ευρήματα παρατήρησαν σε μεταλλάξεις με κατεσταλμένο το ετεροδιμερές Ku [78], τη LigIV [79] και κατεσταλμένους άλλους παράγοντες του D-NHEJ όπως και σε κύτταρα με φυσιολογική επιδιόρθωση στα οποία έγινε χημική αναστολή της δραστηριότητας κινάσης της DNA-PKcs [79].

Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε από την ομάδα του καθηγητή Ηλιάκη στα τέλη της δεκαετίας του '90 [77]. Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός άλλου μηχανισμού ήταν η παρατήρηση ότι κύτταρα MO59J, τα οποία έχουν κατεσταλμένο το γονίδιο DNA-PKcs, (DNA-PKcs deficient) ήταν ικανά να επιδιορθώσουν όλες τις δίκλωνες θραύσεις που είχαν προκληθεί από ιοντίζουσα ακτινοβολία, μολονότι με



### 3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA

Η καταγραφή των βλαβών DNA στα κύτταρα είναι ένα σύνθετο αναλυτικό πρόβλημα, καθώς τα επίπεδα των βλαβών είναι σχετικά χαμηλά, συχνά της τάξεως της μιας αλλοιωμένης βάσης ανά  $10^6$  φυσιολογικές βάσεις. Καθώς πρόκειται για έμβια ύλη, οι όποιες μετρήσεις για να πραγματοποιηθούν οφείλουν να χρησιμοποιούν κατά το δυνατόν λιγότερο βιολογικό υλικό. Οι τεχνικές ανίχνευσης των βλαβών μπορούν να χωρισθούν σε 'άμεσες' και 'έμμεσες'. Οι άμεσες βασιζονται στην Αναλυτική Χημεία και απαιτούν εξαγωγή και κατόπιν πέψη του DNA. Η ανίχνευση γίνεται σε επίπεδο είτε νουκλεοτιδίου, είτε νουκλεοσιδίου ή βάσης με παράλληλη χρήση κάποιου μορίου-ανιχνευτή μέσω χρωματογραφικού διαχωρισμού. Οι έμμεσες μέθοδοι γενικώς μετρούν θραύσεις των κλώνων του DNA. Είτε με την προσθήκη ενός ενζύμου επιδιόρθωσης που μετατρέπει τις αλλοιώσεις σε θραύσης αλυσίδας είτε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν αναπτυχθεί ενάντια σε βλάβες DNA, διάφορες αλλοιώσεις μπορούν να γίνουν ανιχνεύσιμες. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αντισώματα που προσδένονται είτε σε πρωτεΐνες είτε σε τροποποιημένες πρωτεΐνες, όπως η φωσφορυλιωμένη μορφή της ιστόνης H2AX, η  $\gamma$ -H2AX, οι οποίες ανήκουν σε μηχανισμό επιδιόρθωσης DNA καθιστώντας εφικτή την ανίχνευση «εστίων επιδιόρθωσης», οι οποίες ευθέως συνδέονται με τις βλάβες του DNA. Επιπλέον, βιολογικές συνέπειες των αρχικών βλαβών, όπως οι μικροπυρήνες και οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις αξιοποιούνται για την ανίχνευση της βλάβης [4].

#### 3.1 Άμεση ανίχνευση

Η αρχή της άμεσης ανίχνευσης των αλλοιώσεων του DNA, προϋποθέτει την εξαγωγή του DNA από τα κύτταρα, το οποίο υδρολύεται σε μονομερείς μονάδες, είτε σε νουκλεοτιδία, σε νουκλεοσιδία ή σε βάσεις [80]. Αναλυτικές μέθοδοι, στη συνέχεια, διαχωρίζουν τα υδρολυμένα προϊόντα και μέσω μιας εξειδικευμένης μεθόδου ανίχνευσης γίνεται η ποσοτικοποίηση των αλλοιώσεων.

*Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ηλεκτροχημική ανίχνευση* ήταν μία από τις πρώτες μεθόδους ανίχνευσης της 8-οξο-7,8-δωδρο-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine - 8-oxodGuo) [81]. Η αλλοίωση αυτή έχει δυναμικό ιοντισμού χαμηλότερο από τις κανονικές βάσεις, επιτρέποντας την επιλεκτική και ποσοτική ανίχνευσή της. Με τη μέθοδο αυτή επιπλέον ανιχνεύονται και οι 5-υδροξυλ-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-hydroxy-2'-deoxycytidine - 5-HO-

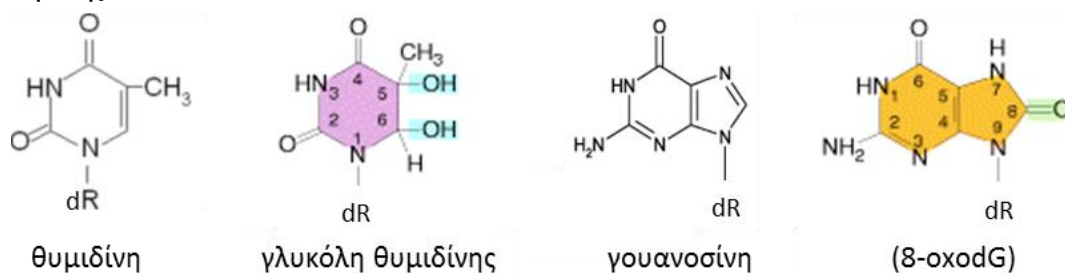
dCyd) και 8-oxodAdo τροποποιήσεις. Συνήθως αυτά τα συστήματα ανίχνευσης συνοδεύονται και από έναν ανιχνευτή στο UV, όχι ιδιαίτερος ευαίσθητο, που μετρά τις φυσιολογικές βάσεις, καθιστώντας άμεση την έκφραση του αριθμού των τροποποιημένων βάσεων ανά εκατομμύριο φυσιολογικών, ενζυματικώς υδρολυμένα δείγματα DNA.

Εκείνη την εποχή, τη δεκαετία του '80, επίσης αναπτύχθηκε μια μέθοδος που συνδυάζει την αέρια χρωματογραφία με έναν φασματογράφο μάζας [82]. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε δείγματα DNA που έχουν υδρολυθεί σε όξινο περιβάλλον, δημιουργώντας ελεύθερες βάσεις. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται και ένα πρόσθετο βήμα παραγωγοποίησης, καθώς οι βάσεις DNA δεν είναι αρκετά πτητικές για να διαχωριστούν με αέρια χρωματογραφία. Τα προϊόντα παραγωγοποίησης ανιχνεύονται με φασματογραφία μάζας. Η μέθοδος αυτή είναι πιο ευέλικτη από την προηγούμενη, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση περισσότερων αλλοιώσεων. Λίγο μόλις καιρό μετά την καθιέρωση των δύο αυτών μεθόδων έγινε αντιληπτό ότι παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους ως προς τα ανιχνευόμενα επίπεδα υποβάθρου [83]. Αργότερα διευκρινίστηκε ότι οι αποκλίσεις οφείλονταν στο στάδιο παραγωγοποίησης της δεύτερης μεθόδου, όπου κατά το στάδιο αυτό προκαλείται οξείδωση στο DNA αυξάνοντας τεχνηέντως τις ανιχνευόμενες βλάβες [84].

### ***3.1.1.1 Η γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με διαδοχική φασματογραφία μάζας***

είναι η πλέον σύγχρονη μέθοδος, μετεξέλιξη των προηγούμενων, η οποία μετρά χαμηλά επίπεδα βλαβών DNA [80]. Η μέθοδος αυτή λόγω μιας τεχνικής «ήπιου» ιονισμού, είναι πολύ ευαίσθητη, τουλάχιστον όσον αφορά τη λειτουργία «παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων», όπου απαιτείται διαδοχική φασματογραφία μάζας. Ισοτοπικώς επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα (internal standards), μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού. Για κάθε παρόμοια τεχνική είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη το ενδεχόμενο ανίχνευσης επιπλέον βλαβών στο DNA οι οποίες να οφείλονται στο ακολουθούμενο πρωτόκολλο, και όχι στην προς διερεύνηση αιτία.

Οι Rouget και συν. κάνοντας «υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ηλεκτροχημική ανίχνευση» και με «υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με διαδοχική φασματογραφία μάζας» κατόρθωσαν να μετρήσουν διάφορες βλάβες DNA σε κύτταρα εκτεθειμένα σε αυξανόμενες δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας [85, 86]. Οι γλυκόλες θυμιδίνης (thymidine glycols)<sup>8</sup> βρέθηκαν να είναι η πιο συχνή βλάβη, και τα επίπεδα επαγωγής τους, περίπου 0,1 τροποποιήσεις ανά 10<sup>6</sup> βάσεις και ανά Gy, βρέθηκαν να είναι 4 φορές υψηλότερα από εκείνα της 8-oxodGuo, ενώ μια πιο πρόσφατη μελέτη τις δείχνει στα ίδια επίπεδα [87]. Η θυμιδίνη είναι το αντίστοιχο δεοξυριβο-νουκλεοσίδιο<sup>9</sup> της Θυμίνης.



Σχήμα 3-1: Οι βλάβες νουκλεοσιδίων που αναφέρονται στο κείμενο, μαζί με τα αντίστοιχα νουκλεοσίδια

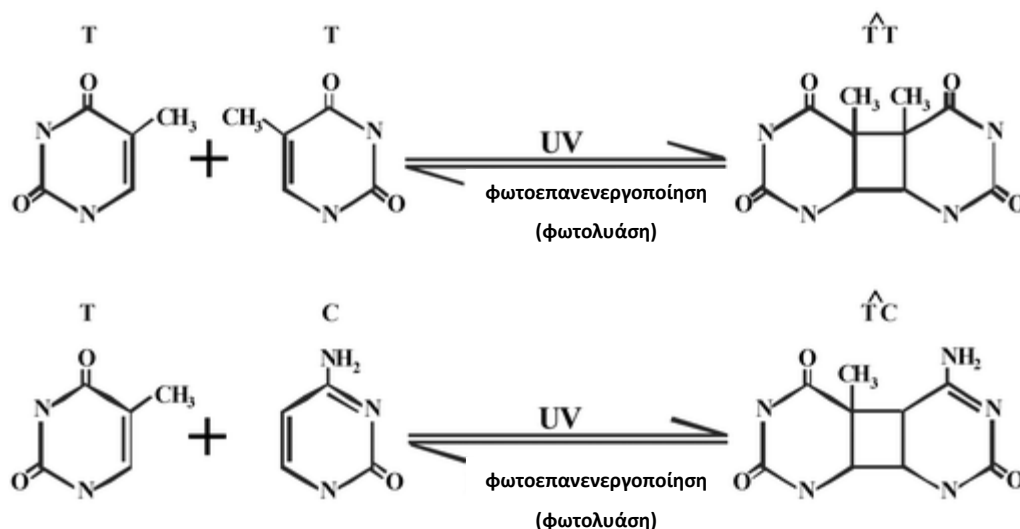
Ενδιαφέρον προκαλεί το εύρημα ότι τα επίπεδα σχηματισμού της FapyGua ήταν δύο φορές υψηλότερα από αυτά της 8-oxodGua, υποδεικνύοντας ότι το DNA βρίσκεται σε αναγωγικό κυτταρικό περιβάλλον, εφόσον είναι γνωστό ότι και οι δύο αυτές αλλοιώσεις προκύπτουν από το ίδιο ενδιάμεσο προϊόν, και επιπλέον ο σχηματισμός της 8-oxodGua απαιτεί όξινες συνθήκες. Αναφέρεται επίσης ότι ο σχηματισμός σύνθετων βλαβών περιλαμβάνει και το σχηματισμό πρόσθετων κυτοσίνης (cytosine adducts) ανιχνεύεται και αυτός με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με διαδοχική φασματογραφία μάζας και τα επίπεδά του είναι περίπου κατά δύο τάξεις χαμηλότερα από εκείνα του σχηματισμού της 8-oxodGua [88], ως εκ τούτου τα επίπεδα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα των δίκλωνων θραύσεων περί τα 40 ανά Gy και ανά κύτταρο.

<sup>8</sup> **Γλοκόλη Θυμιδίνης:** αλλοίωση της θυμιδίνης από ακτινοβολία, όπως φαίνεται στο Σχήμα II-1

<sup>9</sup> **Νουκλεοσίδιο:** ένα νουκλεοτίδιο χωρίς τη φωσφορική ομάδα.

## 3.2 Έμμεση ανίχνευση

Έμμεσες ή βιοχημικές μέθοδοι έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των βλαβών DNA. Οι πρώτες προσπάθειες περιελάμβαναν την ανάπτυξη αντισωμάτων ειδικών έναντι βλαβών DNA. Έτσι, εξειδικευμένα αντισώματα αναπτύχθηκαν έναντι των διμερών πυριμιδίνης που δημιουργεί η παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας [89].



Σχήμα 3-2: Με την παρουσία ακτινοβολίας UV σχηματίζονται διμερή πυριμιδίνης. Αντιστρόφως, η παρουσία της υπεριώδους ακτινοβολίας φωτοεπανενεργοποιεί τις φωτολυάσες, οι οποίες διασπούν αυτά τα διμερή

[90]

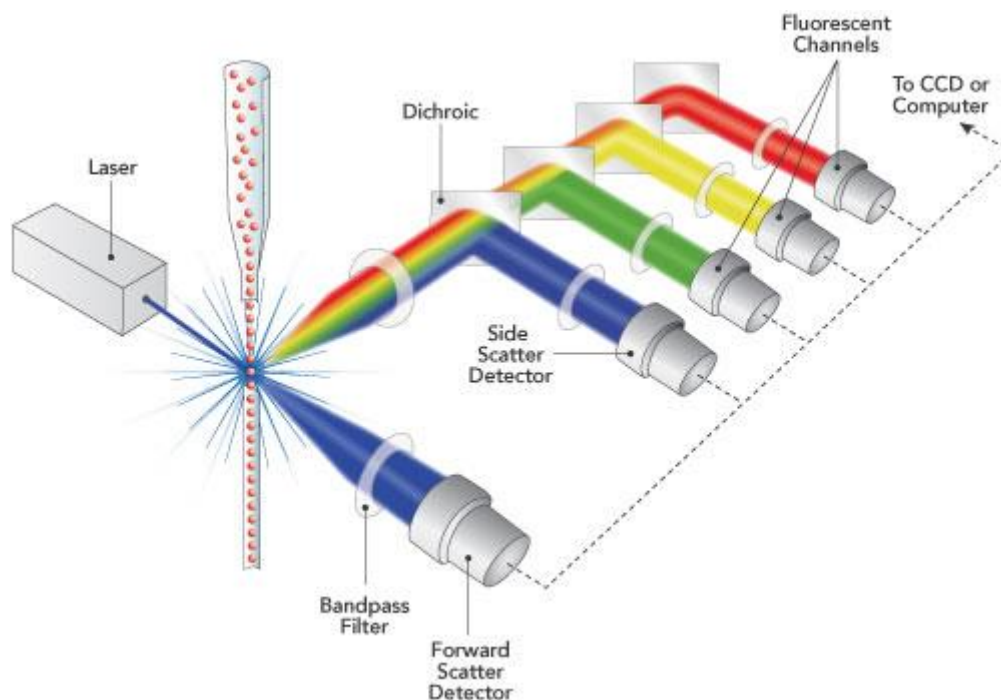
Για τις οξειδωτικές βλάβες και κυρίως για την 8-oxodGua τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν βρέθηκε ότι δεν είναι ικανοποιητικώς επιλεκτικά με αποτέλεσμα η διασταυρούμενη αντίδραση με τις βάσεις γουανίνης να δίνει υπερεκτιμημένα αποτελέσματα [91].

### 3.2.1 Αλκαλική έκπλυση (Alkaline elution)

Η αλκαλική έκπλυση είναι μία παρωχημένη πλέον τεχνική η οποία βασίζεται στη λύση του κυττάρου μέσω αλκαλικού διαλύματος και στη συνέχεια το πέρασμα του διαλύματος από φίλτρο με τη βοήθεια φυγοκέντρισης. Με τη μέθοδο αυτή μετρούνται δίκλωνες και μονόκλωνες θραύσεις, καθώς το πέρασμα από φίλτρο των μακρομορίων είναι ταχύτερο όταν περιέχουν θραύσεις. Η τεχνική αυτή θεωρείτο ευαίσθητη και ακριβής, αλλά είχε μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή επαναληψιμότητα, λόγω των πολλών ενδιάμεσων βημάτων έκπλυσης που απαιτούνται [92].

### 3.2.2 Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι ένα σύστημα που καταγράφει πληροφορίες, δηλαδή οπτικό σήμα, για κύτταρα καθώς εξαναγκάζονται να περάσουν σε μορφή διαλύματος από λεπτή στήλη, φωτιζόμενα από laser ή άλλη οπτική πηγή όταν βρίσκονται μπροστά από τον αισθητήρα. Η αρχική εφαρμογή της μεθόδου αυτής ήταν η ανίχνευση ανευπλοειδίας<sup>10</sup>,



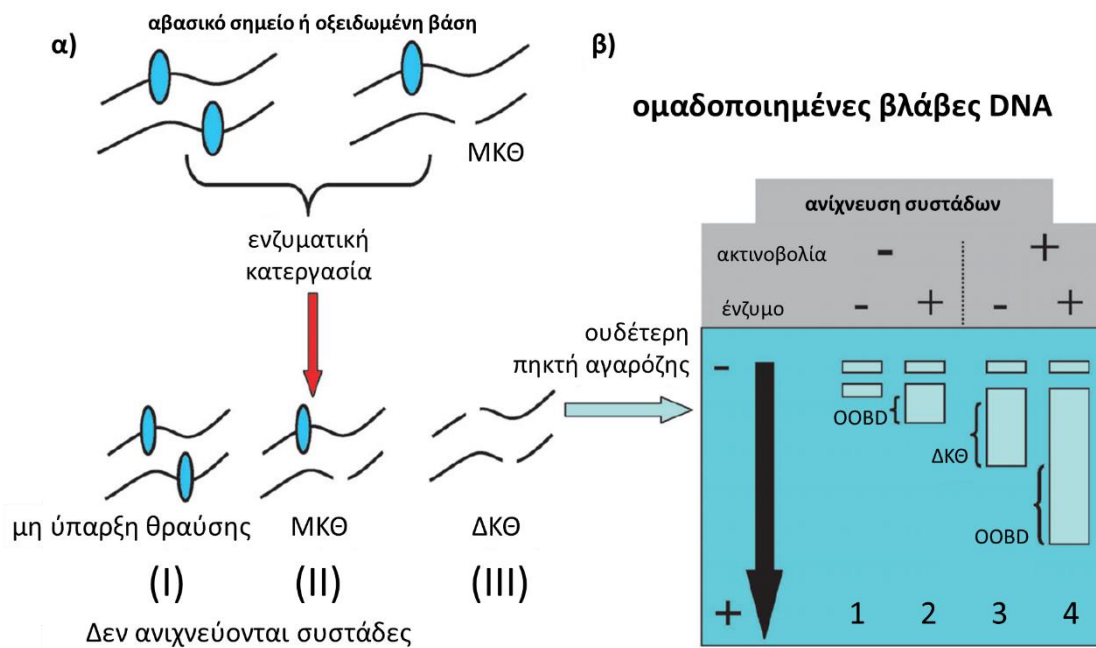
Σχήμα 3-3 Αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής

καθώς η μέθοδος αυτή παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου αλλά και την ένταση φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα για την ανίχνευση οξειδωτικώς επαγόμενων βλαβών DNA η εφαρμογή της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής είναι να συγκρίνει τα επίπεδα φθορισμού μεταξύ των ακτινοβολημένων και των μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Για να ανιχνευτούν οι βλάβες αυτές έχει προηγηθεί χρώση με αντισώματα που ανιχνεύουν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης οξειδωτικών βλαβών [93]. Πρόκειται για αρκετά παλιά πλην όμως γρήγορη τεχνική. Επίσης οι διατάξεις για κυτταρομετρία ροής συνεχώς εξελίσσονται, παρέχοντας όλο και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Μάλιστα εδώ και κάποια χρόνια υπάρχει και το σύστημα FACS (fluorescence-activated cell sorting) το οποίο επιπλέον κατατάσσει, δηλαδή διαχωρίζει το εναιώρημα των κυττάρων σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες ιδιότητες. Πιο πρόσφατες προσεγγίσεις στοχεύουν στην ταυτόχρονη ανίχνευση πρωτεϊνών επιδιόρθωσης DNA, κάνοντας και πάλι χρήση κατάλληλων

<sup>10</sup> ανευπλοειδία ή πολυπλοειδία: η ύπαρξη μη φυσιολογικού αριθμού χρωμοσωμάτων σε ένα κύτταρο.

αντισωμάτων, όπως για παράδειγμα για τις πρωτεΐνες  $\gamma$ -H2AX και πρωτεΐνες του μηχανισμού BER. Ενδεικτικά αναφέρεται η εργασία των Peng και συν. για την πρώτη εκτίμηση των επιπέδων της OGG1 με τη συγκεκριμένη τεχνική [94].

### 3.2.3 Παλμικό πεδίου ηλεκτροφόρηση πηκτής (Pulsed field gel electrophoresis PFGE)



Σχήμα 3-4: Ανίχνευση ομαδοποιημένων βλαβών DNA, εκτεινόμενων και στους δύο κλώνους (ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες DNA, OOBBD), με χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης σε ουδέτερο pH. α) Οι αρχές της ανίχνευσης με τη χρήση ενζύμων επιδιόρθωσης για δύο αντιπροσωπευτικά είδη συστάδων, αποτελούμενων από ζεύγος βλαβών βάσης, ευρισκόμενων και στους δύο κλώνους (I) ή για μονόκλωνη θραύση και οξειδωτική βλάβη στον άλλο κλώνο (II) ή για δίκλωνη θραύση (III). Στις δύο πρώτες περιπτώσεις, τυχόν ατελής αποκοπή και των δύο βλαβών από τα ένζυμα επιδιόρθωσης θα οδηγήσει στη μη ανίχνευση της συστάδας βλαβών. Στην περίπτωση που τα ένζυμα δράσουν και στους δύο κλώνους, θα παραχθεί μία δίκλωνη θραύση η οποία θα επιτρέπει την ανίχνευση της συστάδας. β) Ανίχνευση των συστάδων με χρήση ουδέτερης ηλεκτροφόρησης πήγματος αγαρόζης. Γονιδιακό DNA (T7 ή λ) ή ανθρώπινο σε ένθετα (plugs) αγαρόζης υφίσταται ηλεκτροφόρηση (συνεχούς ή παλμικού πεδίου, ανάλογα με το μέγεθος του DNA). Με την εφαρμογή ανάλυσης μέσου αριθμητικού μήκους οι πρωτογενείς Δίκλωνες Θραύσεις (ΔΚΘ) (prompt DSBs) και Ομαδοποιημένες Οξειδωτικές Βλάβες DNA (OOBBD) μπορούν να μετρηθούν στην ίδια πηκτή. Η σύγκριση μεταξύ των ζωνών 1 και 2 παρέχει τα επίπεδα των ενδογενών OOBBD, δηλαδή του μη ακτινοβολημένου δείγματος, τα οποία συνήθως αναμένονται χαμηλά. Η σύγκριση μεταξύ των ζωνών 3 και 4 παρέχει τα επίπεδα των OOBBD για τα ακτινοβολημένα δείγματα. Στα ακτινοβολημένα δείγματα αναμένεται πολύ υψηλότερος ο αριθμός των OOBBD. Η σύγκριση μεταξύ των ζωνών 3 και 1 δίνει τα επίπεδα των πρωτογενών ΔΚΘ που προκαλούνται κατευθείαν από την ακτινοβολήση. Η στήλη 1 δείχνει τα αρχικά επίπεδα των δίκλωνων θραύσεων, ενώ από την τελευταία λόγω της παρουσίας του ενζύμου οι OOBBD εμφανίζονται ως πρόσθετες δίκλωνες θραύσεις και έτσι γίνεται εφικτή η ανίχνευσή τους. Hada and Georgakilas, 2008 [10].

Για την ανίχνευση δίκλωνων ομαδοποιημένων βλαβών DNA, απομονωμένου από ανθρώπινα κύτταρα ή από κύτταρα θηλαστικών, ή γονιδιακό DNA όπως του T7<sup>11</sup> ή του λ-DNA<sup>12</sup> ή το υπερελικωμένο DNA μια προσέγγιση που χρησιμοποιεί ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA αρχικά αναπτύχθηκε από τους Sutherland και συν. [97]. Η ιδέα της προσέγγισης βασίζεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα επιδιόρθωσης που συμμετέχουν στο Μηχανισμό Εκτομής Βάσης, όπως οι γλυκοζυλάσες DNA και οι ενδονουκλεάσες AP, αναμένεται επίσης να δράσουν *in vitro*, δηλαδή σε απομονωμένο DNA που φέρει ομαδοποιημένες βλάβες. Αφότου τα ένζυμα ανιχνεύσουν τις βλάβες σε κάθε συστάδα βλαβών, θα τις αποκόψουν και θα διασπασούν τον κλώνο του DNA, λόγω της ενδογενούς τους ενεργότητας λυάσης (γλυκοζυλάσες DNA) ή θα διασπασούν άμεσα τον κλώνο στην περίπτωση της ενδονουκλεάσης AP, δημιουργώντας μία μονόκλωνη θραύση σε κάθε κλώνο, δηλαδή μία δίκλωνη θραύση στην περίπτωση της ομαδοποιημένης βλάβης λόγω γειτνίασης των αρχικών βλαβών. Υπάρχει μία επικάλυψη στην εξειδίκευση των Frg, EndoIII και EndoIV στα αβασικά σημεία όπως και των Frg και EndoIII σε κάποια είδη οξειδωμένων βάσεων. Οι επιπλέον δίκλωνες θραύσεις που επάγονται από τα ένζυμα επιδιόρθωσης μπορούν να μετρηθούν με ηλεκτροφόρηση πηκτής συνεχούς ή παλμικού πεδίου, ακολουθούμενης από ανάλυση μέσου αριθμητικού μήκους<sup>13</sup> (number average length analysis -NALA), σύμφωνα με το μέγεθος του εξαχθέντος DNA. Αυτές οι πρόσθετες δίκλωνες θραύσεις θεωρούνται ισάριθμες με τις συστάδες βλαβών που ανίχνευσαν τα ένζυμα. Κατόπιν οι πηκτές χρωματίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο, αποχρωματίζονται κατάλληλα και η ηλεκτρονική απεικόνιση γίνεται μέσω μιας CCD<sup>14</sup> κάμερας. Οι

---

<sup>11</sup> **T7:** βακτηριοφάγος T7, ένας ιός που προσβάλλει επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα, αποτελείται από DNA και μολύνει τα περισσότερα στελέχη της *Escherichia coli*. Έχει ένα λυτικό κύκλο ζωής και πολλές ιδιότητες που τον καθιστούν ιδανικό φάγο για πειραματικές διαδικασίες [95].

<sup>12</sup> **λ-DNA:** DNA από το φάγο-λ. Ο φάγος εντεροβακτηρίων -λ είναι ένας βακτηριοφάγος μεσαίου μεγέθους που προσβάλλει και αυτός την *Escherichia coli* [96]

<sup>13</sup> **ανάλυση μέσου αριθμητικού μήκους:** μέθοδος προσδιορισμού του μέσου μήκους των μακρομορίων που εμφανίζονται σε μια συγκεκριμένη ζώνη μιας λωρίδας στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης. Από αυτό το μέγεθος μπορεί να εξαχθεί και η πληροφορία για την πυκνότητα των δίκλωνων θραύσεων ανά ποσότητα DNA, μετρημένη σε kbp, Mbp ή Gbp. Για αναλυτική περιγραφή της μεθόδου πρβ Sutherland *et al.*, 2003 [98].

<sup>14</sup> **CCD:** Charged Coupling Device, Διάταξη Συζευγμένου Φορτίου: μια συσκευή για τη μεταφορά ηλεκτρικού σήματος από την περιοχή του αισθητήρα σε μια έξοδο που μπορεί να καταγραφεί. Αποτελείται από συστοιχίες πυκνωτών που περιέχουν ημιαγωγίμο υλικό το οποίο επιτρέπει τη μετατροπή των φωτονίων που προσπίπτουν σε ζεύγη ηλεκτρονίου-οπής. Οι οπές κατευθύνονται στη γείωση ενώ τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται από το πηγάδι δυναμικού που δημιουργείται κάτω από το άλλο ηλεκτρόδιο. Για την καταγραφή της εικόνας για κάθε γραμμή από αισθητήρες το σήμα μεταφέρεται διαδοχικά από πυκνωτή σε πυκνωτή μέχρι να συλλεχθεί από την άκρη της γραμμής, δηλαδή πρόκειται για καταχωρητές ολίσθησης.

ηλεκτρονικές εικόνες στη συνέχεια αναλύονται με λογισμικό που μετράει την πυκνότητα ακτινοβολίας (φωτεινότητα ανά μονάδα επιφάνειας) και ένα διάγραμμα πυκνότητας ακτινοβολίας εξάγεται από κάθε λωρίδα της πηκτής. Μια καμπύλη διασποράς του DNA η οποία συσχετίζει το μήκος του DNA με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, βασισμένη σε όλα τα πρότυπα μήκους (DNA markers) προσδιορίζεται από μια αναλυτική συνάρτηση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των μορίων DNA. Από τα προφίλ των ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων (ή των επεξεργασμένων με ένζυμα και των μη επεξεργασμένων πληθυσμών DNA), το μέτρο «μέσο μήκος,  $\bar{L}$ , καθενός πληθυσμού DNA υπολογίζεται και το πλήθος των δίκλωνων θραύσεων ή των συστάδων βλαβών υπολογίζεται, όπως περιγράφεται στο **Σχήμα 3-4** [10].

Η ευαισθησία της μεθόδου περιορίζεται στα 3-5 Gy για τις δίκλωνες θραύσεις ενώ για τις ΟΟΒΔ αυξάνεται στο 1 Gy [99]. Με την παραπάνω μέθοδο υπολογίζεται ο λόγος των ΔΚΘ προς τις ΟΟΒΔ να ισούται με 3-5 [10].

#### **3.2.4 Comet Assay- Τεχνική του Κομήτη**

Η Τεχνική του Κομήτη ή αλλιώς της ηλεκτροφόρησης γέλης μεμονωμένου κυττάρου (Single Cell Gel Electrophoresis) είναι μία επίσης ευαίσθητη τεχνική, ικανή να ανιχνεύσει διαφορετικά είδη βλαβών όπως δίκλωνες θραύσεις αλλά και τις λοιπές ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες, πλην των δίκλωνων θραύσεων (βλάβες βάσεων και μονόκλωνες θραύσεις).

Η τεχνική αυτή μπορεί να περιγραφεί ως μία τεχνική ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων εγκλεισμένων σε μικρογέλη. Με τα κατάλληλα ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν έκαστο διαφορετική βλάβη κόβεται στα αντίστοιχα σημεία το μακρομόριο. Στη συνέχεια το πήκτωμα αγαρόζης υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση εντός ιοντικού ρυθμιστικού διαλύματος. Ανάλογα με το μέγεθός τους, τα διάφορα τμήματα του DNA απομακρύνονται σε διαφορετικό βαθμό από τον ακλόνητο πυρήνα, δημιουργώντας την άλω κάθε πυρήνα, η οποία στο μικροσκόπιο φθορισμού έχει τη μορφή κομήτη (εξ ου και το όνομα της μεθόδου). Η επεξεργασία των εικόνων φθορισμού γίνεται με κατάλληλο λογισμικό το οποίο μετράει την ένταση φθορισμού και την απόσταση από τον πυρήνα, παρέχοντας το μέγεθος της έκτασης της ουράς του κομήτη [100].



### 3.2.5 *In situ* Ανοσοφθορισμός

Για τη μελέτη των ομαδοποιημένων βλαβών αλλά και των δίκλωνων DNA στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μέθοδος που κυρίως εφαρμόζεται είναι ο *in situ* έμμεσος ανοσοφθορισμός. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στα αντισώματα, πρωτεΐνες κατασκευασμένες από εταιρίες με την ιδιότητα να προσδένονται επιλεκτικά σε άλλες -τις προς ανίχνευση- πρωτεΐνες. Η μέθοδος λέγεται «έμμεσος» για δύο λόγους: αφενός γιατί απαιτείται και ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερεύον) το οποίο θα αναγνωρίζει ως αντιγόνο το πρώτο αντίσωμα (πρωτεύον) και ταυτοχρόνως φέρει μια φθορίζουσα χρωστική, με αποτέλεσμα, όταν το δείγμα εξεταστεί σε μικροσκόπιο φθορισμού, το δεύτερο αντίσωμα να φθορίζει, κάνοντας έτσι εμμέσως ορατή την προς ανίχνευση πρωτεΐνη και αφετέρου διότι οι προς ανίχνευση πρωτεΐνες, είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και όχι οι βλάβες αφεαυτές, οπτικοποιώντας και πάλι εμμέσως τις βλάβες, μέσω των ενζύμων επιδιόρθωσης.

### 3.3 Ανίχνευση βλαβών μέσω των βιολογικών τους επιπτώσεων

#### 3.3.1 Κλασική κυτταρογενετική μέθοδος

Μία άλλη μέθοδος που προσφέρεται για τη μέτρηση βλαβών DNA είναι η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος. Με τη μέθοδο αυτήν δε μετρούνται οι βλάβες αφεαυτές αλλά οι συνέπειες που προκαλούνται σε χρωμοσωματικό επίπεδο καθώς το κύτταρο μπαίνει στη μίτωση και η καλλιέργεια σταματάει στο στάδιο της μετάφασης. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την κλασική μεθοδολογία βιοδοσιμετρίας. Τα δικεντρικά χρωμοσώματα τα οποία εμφανίζονται με συχνότητα 10 φορές μεγαλύτερη από τους δακτυλίους, συνοδεύονται συνήθως από χρωμοσωματικά θραύσματα, η ύπαρξη των οποίων αποτελεί κριτήριο για την καταμέτρησή τους. Η συχνότητα εμφάνισής τους ανά κύτταρο είναι συνάρτηση της απορροφημένης δόσης. Χρησιμοποιώντας τις αλλοιώσεις αυτές ως δείχτη της έκθεσης, η απορροφημένη δόση προσδιορίζεται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς οι οποίες κατασκευάζονται από *in vitro* ακτινοβόληση περιφερικού αίματος. Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς έχουν γενικά μορφή γραμμική-δευτεροβάθμια :

$$Y = \gamma + \alpha D + \beta D^2$$



Σχήμα 3-4: Κλασική κυτταρογενετική μέθοδος. Δύο μεταφάσεις λεμφοκυττάρων που ακτινοβολήθηκαν με 6 Gy όταν βρίσκονταν στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου. Διακρίνονται οι εξής χρωμοσωματικές αλλοιώσεις: αριστερά) τρία δικεντρικά χρωμοσώματα και τα αντίστοιχά τους ακεντρικά θραύσματα, δεξιά) ένας κεντρικός δακτύλιος (με κεντρομερίδιο) και ένα τρικεντρικό χρωμόσωμα. Εικόνα από τη διπλωματική εργασία της γράφουσας [2].

όπου  $Y$  ο αριθμός δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο,  $D$  η απορροφημένη δόση ακτινοβολίας (σε grays), και  $\alpha$  &  $\beta$ , συντελεστές που εξαρτώνται από παράγοντες όπως το είδος ακτινοβολίας, δίνονται από πίνακες.

Σε ολόσωμες οξείες εκθέσεις μεγαλύτερες από 0.1 gray, η μελέτη των επαγομένων δικεντρικών χρωμοσωμάτων είναι ικανή να προσδιορίσει την απορροφημένη δόση ακτινοβολίας με ικανοποιητική ακρίβεια (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%), βάσει της στατιστικής Poisson. Τα επαγόμενα από την ακτινοβολία δικεντρικά χρωμοσώματα, στα οποία βασίζεται η κλασική αυτή μεθοδολογία βιοδοσιμετρίας, είναι από τη φύση τους ασταθή. Αυτό οφείλεται στον πεπερασμένο χρόνο ζωής των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και στην αντικατάστασή τους μετά από πολλαπλασιασμό αρχέγονων κυττάρων κυρίως του μυελού των οστών. Η αντικατάσταση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος πραγματοποιείται από νέα που δεν φέρουν τέτοιου είδους μη συμβατές με την κυτταρική διαίρεση αλλοιώσεις. Ο χρόνος ζωής των λεμφοκυττάρων είναι περίπου 3 χρόνια [2, 101].

Η κλασική αυτή μεθοδολογία, όταν τα χρωμοσώματα οπτικοποιούνται με απλή χρώση Giemsa έχει την ικανότητα να ανιχνεύει εκθέσεις έως και 5 Gy. Σύμφωνα όμως με τα νεότερα ευρήματα του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», εάν ακολουθηθεί η μέθοδος FISH<sup>15</sup>, δηλαδή γίνει υβριδισμός με ιχνηθέτες για τα τελομερή και τα κεντρομερίδια, και γίνει η χρώση με Dapi, και εάν προστεθεί ένα στάδιο επώασης 3 h με καφεΐνη, η οποία παρακάμπτει το σημείο ελέγχου G2 του κυτταρικού κύκλου, τότε αυξάνεται η ικανότητα της μεθόδου και μπορεί να ανιχνεύει εκθέσεις έως και τα 20 Gy [102].

### 3.3.2 Μέθοδος της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC)

Για τον προσδιορισμό της απορροφημένης δόσης σε πολύ πιο σύντομο χρονικό διάστημα χρησιμοποιείται η μέθοδος πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC). Συγκεκριμένα σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μονοπυρηνικά κύτταρα, συνήθως λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, συντήκονται με μιτωτικά κύτταρα hamster (CHO) υπό την επίδραση μιας χημικής συντηξιογόνου ουσίας (πολυαιθυλενγλυκόλης - PEG). Κατά τη σύντηξη, η πυρηνική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου σπάει, με αποτέλεσμα να γίνεται ορατό το εσωτερικό του πυρήνα τους, χωρίς αυτά να βρίσκονται στη φάση της μίτωσης. Έτσι είναι δυνατή η

---

<sup>15</sup> FISH: fluorescence *in situ* hybridization:

απευθείας ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε μεσοφασικά χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, αποφεύγοντας την καθυστέρηση των 48 ωρών της κλασσικής κυτταρογενετικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας που αναφέρθηκε προηγουμένως [2]. Και τούτη η τεχνική, εάν συνδυαστεί με FISH, και πραγματοποιηθεί δηλαδή η χρώση των τελομερών και των κεντρομεριδίων με φθορίζοντες ιχνηθέτες, παράγει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα [103].

### 3.3.3 Μέθοδος των μικροπυρήνων (*Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*)

Με τη χρήση της τεχνικής των μικροπυρήνων, ανιχνεύονται χρωμοσωματικά θραύσματα ή άθικτα χρωμοσώματα τα οποία έχουν καθυστερήσει στην ανάφαση ως αποτέλεσμα καταστροφής της ατράκτου και δεν έχουν ενσωματωθεί σε κάποιο θυγατρικό πυρήνα κατά την κυτταρική διαίρεση. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου, είναι η κατάληξη των χρωμοσωματικών θραυσμάτων (ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων) σε νεοσχηματιζόμενους μικρούς πυρήνες (μικροπυρήνες) [2]. Είναι μία καθιερωμένη τεχνική που έχει εγκριθεί και από τη Διεθνή Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας για τη βιοδοσιμετρία ιοντίζουσας ακτινοβολίας, για *in vitro* δοκιμές γενετικής τοξικολογία στη φαρμακευτική βιομηχανία, κ.α. [104].

Η τεχνική αυτή αποτελεί ένα ολοκληρωμένο σύστημα για την εκτίμηση της βλάβης του DNA, την κυτταρόσταση και την κυτταροτοξικότητα, σε χρωμοσωματικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, οι βλάβες στο DNA καταμετρούνται σε άπαξ διαιρεμένα διπύρηνα κύτταρα και εκδηλώνονται ως α) μικροπυρήνες, ένας βιοδείκτης των χρωμοσωματικών θραύσεων ή και της καθολικής απώλειας χρωμοσώματος, β) πυρηνοπλασμικές γέφυρες, ένας βιοδείκτης της λανθασμένης επιδιόρθωσης του DNA ή και της σύντηξης των τελομερών και γ) ως πυρηνικοί δορυφόροι, ένας βιοδείκτης της αποβολής του ενισχυμένου DNA ή / και των συμπλόκων επιδιόρθωσης.

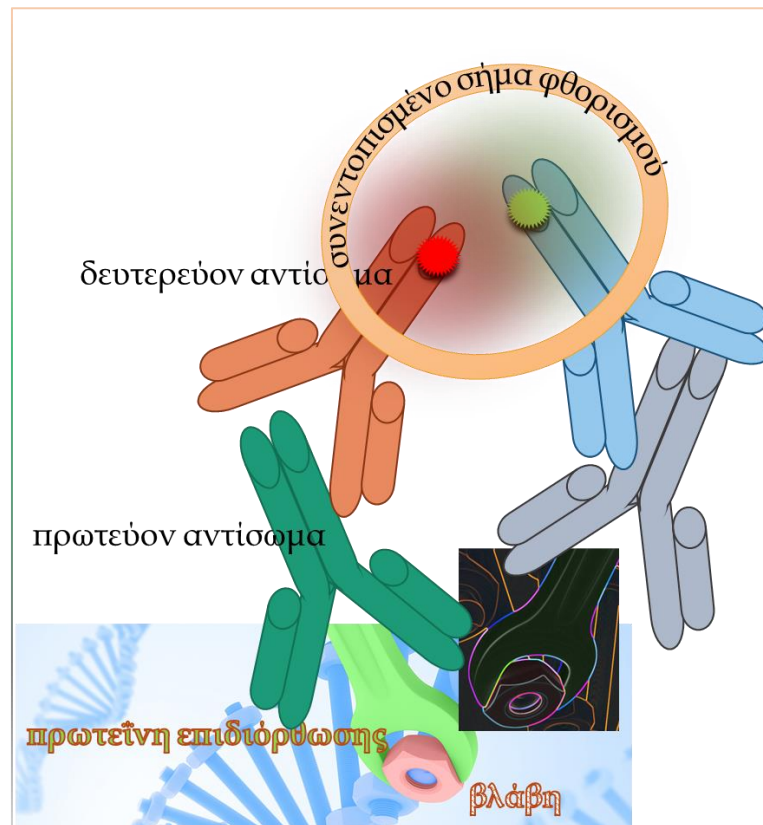
Τα κυτταροστατικά φαινόμενα μετρούνται μέσω του ποσοστού των μονο-, δι - και πολυπύρηνων κυττάρων και η κυτταροτοξικότητα μετράται μέσω της αναλογίας νεκρωτικών και / ή αποπτωτικών κυττάρων. Η τεχνική εμπλουτίζεται με τη χρήση δεικτών επισήμανσης των κεντρομεριδίων και των τελομερών. Η τεχνική εφαρμόζεται με επιτυχία για τη βιολογική παρακολούθηση της *in vivo* έκθεσης σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA, στον *in vitro* γονιδιοτοξικό έλεγχο και σε διάφορα άλλα πεδία έρευνας όπως της γονιδιοματικής των θρεπτικών ουσιών και της φαρμακογονιδιοματικής. Επίσης χρησιμοποιείται και για την εκτίμηση της ακτινοευαισθησίας υγιών ιστών και όγκων [105].

# Β' – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Ανοσοφθορισμός

Για τη μελέτη της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, δίκλωνων θραύσεων και σύνθετων βλαβών η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ο *in situ* έμμεσος ανοσοφθορισμός.



Σχήμα 4-1: Αρχή λειτουργίας του *in situ* έμμεσου ανοσοφθορισμού, καθώς και της ανίχνευσης των σύνθετων βλαβών DNA. Η βλάβη που φέρει το DNA (σχηματικά ροζ λαξιμάδι) αρχικώς ανιχνεύεται από μία πρωτεΐνη επιδιόρθωσης (σχηματικά πράσινο γαλλικό κλειδί), του ίδιου του κυττάρου. Για την οπτικοποίηση της βλάβης, στο εργαστήριο, αρχικά προστίθεται το πρωτεΐνη αντίσωμα, το οποίο προσδένεται επιλεκτικά στην πρωτεΐνη επιδιόρθωσης. Το δευτερεύον αντίσωμα του οποίου η ουρά φθορίζει, ανιχνεύει το πρώτο και έτσι η βλάβη οπτικοποιείται έμμεσα, αφού ο στόχος του ζεύγους των αντισωμάτων είναι η πρωτεΐνη επιδιόρθωσης και όχι η ίδια η βλάβη. Μια δεύτερη βλάβη που βρίσκεται πολύ κοντά στην πρώτη, μπορεί να ανιχνευτεί από ένα άλλο ζεύγος αντισωμάτων που να προσδένονται σε άλλη πρωτεΐνη επιδιόρθωσης, του ίδιου ή άλλου μηχανισμού επιδιόρθωσης. Η χωροχρονική σύμπτωση των σημάτων που παρατηρείται στο μικροσκόπιο (συνεντοπισμός) είναι η ένδειξη της ύπαρξης σύνθετης βλάβης DNA, εφόσον ο συνδυασμός των επιλεγμένων αντισωμάτων δεν στοχεύει σε πρωτεΐνες που ανήκουν στον ίδιο μηχανισμό επιδιόρθωσης.

Η αρχή της μεθόδου επεξηγείται στο Σχήμα 4-1, καθώς και η έννοια του συνεντοπισμού των σημάτων φθορισμού, μέσω του οποίου ανιχνεύεται η ύπαρξη σύνθετων βλαβών, υπό

την προϋπόθεση ότι τα επιλεγμένα ζεύγη αντισωμάτων στοχεύουν σε πρωτεΐνες επιδιόρθωσης που ανήκουν σε διαφορετικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA.

Στην παρούσα διατριβή η ύπαρξη σύνθετης βλάβης εξετάζεται με βάση τη δίκλωνη θραύση του DNA, στη γειτονιά της οποίας διερευνάται ο φθορισμός που προέρχεται από αντισώματα που στοχεύουν σε πρωτεΐνες επιδιόρθωσης άλλων μηχανισμών, όπως η πρωτεΐνη APE1 του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης και της OGG1 από το Μηχανισμό Εκτομής Νουκλεοτιδίων.

Για την ανίχνευση των ΔΚΘ για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί η στόχευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX, η οποία συμβολίζεται ως γ-H2AX, καθώς όταν πρωτοδιατυπώθηκε η μέθοδος, οι βλάβες στο DNA είχαν προκληθεί από ακτινοβολία γ. Η χρήση της ιστόνης γ-H2AX ως δείκτη δίκλωνων θραύσεων DNA ξεκίνησε από πειράματα ηλεκτροφόρησης από την Έμμη Ρογκάκου και τον William Bonner το 1998 [106], όπου διαπιστώθηκε ότι οι ΔΚΘ συσχετίζονται με τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX στη σερίνη 139 στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη δημιουργία αντισωμάτων που στοχεύουν τη γ-H2AX και έκτοτε η μέθοδος ανίχνευσης της γ-H2AX χαίρει ευρείας αποδοχής για τον εντοπισμό των ΔΚΘ. Μάλιστα θεωρείται πλέον το καθιερωμένο πρότυπο για την ανίχνευση των ΔΚΘ [4, 107-109]. Η μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX χρησιμοποιείται για βιοδοσιμετρία σε περίπτωση έκθεσης στην ΙΑ [110, 111], για την ανίχνευση προκαρκινικών κυττάρων και την εκτίμηση του σταδίου του καρκίνου [112].

#### *Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου της γ-H2AX*

Η μέθοδος αυτή είναι για πολλούς λόγους η καλύτερη και πιο ευαίσθητη για την *in situ* ανίχνευση των δίκλωνων θραύσεων. Το κύριο προτέρημά της είναι ότι η φωσφορυλιωμένη ιστόνη δεν υπάρχει ενδογενώς στα κύτταρα, αλλά πρόκειται για μία τροποποίηση η οποία συμβαίνει εφόσον υπάρξει ΔΚΘ. Σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης που παρουσιάζουν ενδογενείς συγκεντρώσεις και μετά την ακτινοβολία απλώς ανιχνεύουμε τη μετανάστευσή τους στην υποκυττάρια περιοχή της βλάβης, όπως για παράδειγμα η 53PB1, που έχει χρησιμοποιηθεί και στην παρούσα διατριβή και σχολιάζεται στα επόμενα. Η γ-H2AX δεν παρουσιάζει σήμα υποβάθρου<sup>16</sup>, παρά μόνο κατά περίπτωση ατελούς

---

<sup>16</sup> Εξαιρέση αποτελούν οι περιπτώσεις α) κατά τη μείωση στο στάδιο του παχυντιού το ζεύγος των συμπλεκωμένων φυλετικών χρωμοσωμάτων (X-Y) παραμένει πλήρως καλυμμένο με γ-H2AX, χωρίς να σχετίζεται με ΔΚΘ [113] β) η έκθεση σε UV-C προκαλεί σχηματισμό μικρο-εσθίων [114] και κατά την απόπτωση [115].

πρωτοκόλλου που έχει σαν αποτέλεσμα τη μη επαρκή παρεμπόδιση (blocking) της μη επιλεκτικής πρόσδεσης των αντισωμάτων (unspecific binding). Το άλλο πολύ σπουδαίο πλεονέκτημά της είναι ότι είναι «πανταχού παρούσα» η μη τροποποιημένη της μορφή, δηλαδή η ιστόνη H2AX υπάρχει, στον άνθρωπο, σε ποσοστό 10% στα νουκλεοσώματα. Πολύ σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι μία ΔΚΘ μπορεί να προκαλέσει τροποποιήσεις σε μια έκταση της χρωματίνης περί τα 2 Mbp<sup>17</sup> και να φωσφορυλιωθούν περί τα 2000 μόρια ιστόνης H2AX [106]. Το αποτέλεσμα είναι ότι μέσω του ανοσοφθορισμού εντοπίζονται μεγάλες και φωτεινές εστίες φθορισμού, κάνοντας εφικτή την οπτικοποίηση των βλαβών. Γενικά θεωρείται ότι για ακτινοβολία -γ και -Χ η αντιστοιχία των ΔΚΘ με τις εμφανιζόμενες εστίες, σε ένα μεγάλο εύρος δόσεων, είναι '1:1'.

Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX επιτελείται από την ATM, την ATR ή την DNA-PKcs, εναλλακτικά ή συμπληρωματικά, εάν κάποια από αυτές (που είναι όλες τους μέλη της οικογένειας PIKK<sup>18</sup>) είναι γενετικώς ανενεργή [116]. Συμβαίνει στα πρώτα στάδια της ανίχνευσης της ΔΚΘ, ανεξάρτητα από τον ποιον μηχανισμό επιδιόρθωσης θα επιλέξει το κύτταρο (τον Ομόλογο Ανασυνδυασμό ή τη Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων).

Για τη μελέτη των σύνθετων βλαβών DNA, χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή ως άξονας οι εστίες φθορισμού που δημιουργούν οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των ΔΚΘ (γ-H2AX ή 53BP1) και διερευνάται πάνω σε αυτές τις εστίες η ύπαρξη σήματος φθορισμού από άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης (APE1 ή OGG1) που ανήκουν στο Μηχανισμό Εκτομής Βάσης, που είναι υπεύθυνος για τις βλάβες βάσεων. Η μέθοδος λοιπόν που ακολουθείται για την εκτίμηση των σύνθετων βλαβών είναι η διερεύνηση της ύπαρξης συνεντοπισμού (colocalization), όπως παραστατικά δίνεται στο **Σχήμα 4-1**.

Επιλέχθηκαν συγκεκριμένα, αυτές οι πρωτεΐνες, όπως προτείνονται από τους Hada and Georgakilas [10]. Η APE1 (Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1) είναι μια πρωτεΐνη, ενδονουκλεάση, με κυρίαρχο ρόλο στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Λειτουργεί ως απουρινική/απυριμιδική ενδοδεοξυριβονουκλεάση στο Μηχανισμό Εκτομής Βάσης, επιδιορθώνοντας βλάβες που έχουν προκληθεί από οξειδωτικούς ή αλκυλιωτικούς παράγοντες. Εκκινεί την επιδιόρθωση των αβασικών σημείων καταλύοντας την υδρολυτική εκτομή του φωσφοδιεστερικού σκελετού ακριβώς δίπλα στη βλάβη δημιουργώντας μία μονόκλωνη θραύση.

---

<sup>17</sup> **Mbp**: mega base-pairs. Σε ζεύγη βάσεων μετράται το μήκος του DNA.

<sup>18</sup> **PIKK**: Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases είναι οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης

Η OGG1 (8-Oxoguanine DNA Glycosylase) είναι ένα ένζυμο (πρωτεΐνη) υπεύθυνο για την εκτομή της 8-οξογουανίνης. Η τελευταία είναι ένα μεταλλαξογόνο παραπροϊόν βάσης, το οποίο εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε δραστικό οξυγόνο. Η δράση του ενζύμου OGG1, που είναι μία γλυκοζυλάση περιλαμβάνει τη δραστικότητα λυάσης, για την εκτομή της αλυσίδας, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Αντίστοιχες μελέτες συνεντοπισμού επιχειρήθηκαν στο παρελθόν από τους Asaithamby and Chen [47].

## 4.2 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας

Επελέγησαν πλήθος από κυτταρικές σειρές και συνθήκες ακτινοβολήσης ώστε αρχικά να προσδιοριστεί και να εφαρμοστεί ένα πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού ικανό να οπτικοποιήσει όσα οι θεωρητικές προβλέψεις υπαγορεύουν. Όλες οι αναφερόμενες κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν στους 37°C σε διυγραινόμενη ατμόσφαιρα (5% CO<sub>2</sub>, 95% αέρας) και αφέθηκαν να αναπτύσσονται έως ότου να φτάσουν σε πληρότητα στην πλάκα μικροσκοπίου ή στην καλυπτρίδα όπου έγινε η καλλιέργεια 70-80% και μετά ακτινοβολούνταν.

**MCF7** (ATCC; HTB22) ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) συμπληρωμένο με 10% θερμικώς απενεργοποιημένο εμβρυϊκό ορό μόσχου (fetal bovine serum, FBS), 1% L-glutamine και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη [penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml)]. Η ετοιμασία των πλακών μικροσκοπίου περιελάμβανε τη φυσική οριοθέτηση του χώρου όπου θα αναπτύσσονταν οι κυτταρικές αποικίες με υδρόφοβο μαρκαδόρο (Liquid Blocker super rap pen, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Στη συνέχεια οι πλάκες βυθίζονταν για τουλάχιστον 24 h σε καθαρή αιθανόλη και αφήνονταν να στεγνώσουν σε στείρο περιβάλλον. Τα κύτταρα σπέρνονταν στην περιγεγραμμένη περιοχή σε 200 µl θρεπτικού μέσου. Τα πλακάκια επωάζονταν μέσα σε τρυβλία Petri στον κλίβανο επώασης έως ότου τα κύτταρα να προσκολληθούν σε αυτά. Στη συνέχεια (μετά από 1,5-2 h) επιπλέον θρεπτικό μέσο (10ml) προστίθετο στα τρυβλία. Για το πείραμα που περιείχε τον αναστολέα επιδιόρθωσης της DNA-PKcs, NU7026 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), ο αναστολέας προστίθετο στο θρεπτικό μέσο 24 h πριν την ακτινοβολήση, σε τελική συγκέντρωση 10 µmol/l. Μετά την ακτινοβολήση τα κύτταρα του συγκεκριμένου πειράματος επωάστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο.



**FEF18-11-T1** (Gibco, Paisley, UK; Cat. No. 12332-011), ανθρώπινα πρωτογενή φυσιολογικά αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο για αυτά θρεπτικό μέσο (Keratinocyte-SFM; Invitrogen, Paisley, UK; Cat. No. 17005-042) το οποίο αποτελείται από το κυρίως μέσο (Cat. No. 17024-011) συμπληρωμένο με τον ανθρώπινο επιδερμικό παράγοντα ανάπτυξης rEGF (2.5 µg; Cat. No. 10450-013) και το εκχύλισμα υποφύσεως μόσχου (25 mg; Cat. No. 13026-014) σε συνολικό όγκο 500 ml. Τα κύτταρα σπάρθηκαν σε πλακάκια-φλάσκες 2 μέρες πριν την ακτινοβολήση.

**HepG2**, ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HepG2, ATCC; HB-8065) καλλιεργήθηκαν σε  $\alpha$ -medium (modified MEM, Pan-Biotech, Aidenbach, Germany) με 10% FBS. Για την εβδομαδιαία ανακαλλιέργεια τα κύτταρα πλενότουσαν με PBS πριν την αποκόλληση τους με διάλυμα τρυψίνης/EDTA (PAN-Biotech). Στη συνέχεια τα κύτταρα σπέρνονταν σε πυκνότητα  $3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> σε νέες φλάσκες. Το θρεπτικό μέσο αλλάζόταν κάθε 4 ημέρες. Για τη διεξαγωγή του αντιστοιχού πειράματος τα κύτταρα HepG2 σπάρθηκαν σε πλακάκια-φλάσκες επιφάνειας 8,6 cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde, Denmark) με 3 ml θρεπτικού μέσου και πάλι σε πυκνότητα  $3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>. Για να αποφευχθεί τυχόν αποκόλληση των κυττάρων από τα πλακάκια κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης οι φλάσκες επιστρώθηκαν με poly-L λυσίνη (0,6 µg/cm<sup>2</sup>) για 15 min στους 37°C και εκπλύθηκαν 3 φορές με στείρο αποσταγμένο νερό. Μετά τη σορά τους τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στον πυθμένα της κάθε φλάσκας και έφτασαν σε πληρότητα 70% τη στιγμή της ακτινοβολήσης. Τα πλακάκια-φλάσκες πληρώθηκαν με θρεπτικό μέσο ακριβώς πριν τη στιγμή της ακτινοβολήσης, σφραγίστηκαν και ακτινοβολήθηκαν, όπως περιγράφεται στα επόμενα.

**A549** (ATCC, CCL-185), ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνωμα του πνεύμονα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες διαμέτρου 18 mm, επιστρωμένες με poly-L-λυσίνη. Κάθε καλυπτρίδα τοποθετείτο σε τρυβλίο διαμέτρου 35 mm και σπέρνοντουσαν  $0,15 \times 10^6$  κύτταρα σε κάθε ένα. Το θρεπτικό μέσο ήταν McCoy's 5A συμπληρωμένο με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (fetal calf serum-FCS).

**MO59K-MO59J** (ATCC, CRL-2365/2366), ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's modified Eagle's medium-F-12 συμπληρωμένο με 10% ορό μόσχου που περιέχει επιπλέον σίδηρο (HyClone, Logan, UT). Όπως και τα A549 έτσι και αυτά καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και σπάρθηκαν κατά  $0,3 \times 10^6$  και  $0,2 \times 10^6$  αντιστοιχα. Τα M059K/J θεωρούνται κατάλληλο πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της πρωτεΐνης κινάσης DNA (DNA-PK) σε κυτταρικές ή μοριακές διεργασίες που αφορούν την αναγνώριση ή την επιδιόρθωση βλαβών DNA. Τα κύτταρα MO59J υστερούν

παντελώς στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της DNA-PK, DNA-PKcs<sup>19</sup>, για αυτόν το λόγο είναι κατά πολύ λιγότερο ικανά στην επιδιόρθωση του DNA σε αντίθεση με τα ισογονιδιακά<sup>20</sup> τους τα MO59K, λόγω μιας μετάλλαξης μετατόπισης πλαισίου<sup>21</sup>.

### 4.3 Εκθέσεις σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκαν ακτινοβολήσεις σε διάφορα ερευνητικά κέντρα. Ο μεγαλύτερος όγκος των πειραμάτων έγιναν στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», υπό την καθοδήγηση της Δρα Τερζούδη. Πολλά πειράματα επίσης εκτελέστηκαν στο εργαστήριο του Καθηγητή Ηλιάκη στο Essen της Γερμανίας. Μας εστάλησαν κώτταρα ακτινοβολημένα είτε με ακτίνες-Χ είτε με ιόντα Αργού από τη συνεργάτιδά μας Christine Hellweg από το Γερμανικό Κέντρο Αεροδιαστημικής στην Κολωνία. Η συνεργάτιδά μας Καθηγήτρια Olga Martin, από το Peter MacCallum Cancer Centre της Μελβούρνης ακτινοβόλησε για εμάς και μας έστειλε κερατινοκώτταρα ακτινοβολημένα με ακτίνες  $\gamma$ .

#### 4.3.1 ακτίνες- $\gamma$

Κώτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri που περιείχαν από ένα αποστειρωμένο πλακίδιο μικροσκοπίου. Συρρέουσες καλλιέργειες κυττάρων (δηλ. σε φάση κυτταρικού κύκλου G1/G2) ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες- $\gamma$  στην πηγή Κοβαλτίου-60 που βρίσκεται στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (<sup>60</sup>Co GammaCell 220 irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd., Ottawa, Canada) σε διάφορες δόσεις έως και 4 Gy (LET: 0.3 keV/ $\mu$ m, ρυθμός δόσης κατά την περίοδο της ακτινοβόλησης: 0.3 Gy/min).

Κώτταρα FEP18-11-T1 ακτινοβολήθηκαν με 0.1, 1 και 2 Gy σε πηγή Καισίου-137 (<sup>137</sup>Cs source, GammaCell 40 Irradiator, Nordion International, Ottawa, ON, Canada), με ρυθμό δόσης κατά την περίοδο της ακτινοβόλησης 0.531 Gy/min. Η μονιμοποίηση έγινε με παραφορμαλδεΰδη 4% 1, 6 και 24 h μετά την ακτινοβόληση.

---

<sup>19</sup> DNA-PKcs: DNA-PK catalytic subunit

<sup>20</sup> **ισογονιδιακά:** που έχουν πανομοιότυπα σύνολα γονιδίων [117]

<sup>21</sup> **μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου:** συμβαίνει στην αλυσίδα του DNA κατά την εισαγωγή ή τη διαγραφή νουκλεοτιδίων όταν ο αριθμός τους δεν είναι πολλαπλάσιο του τρία, ώστε κάθε κωδικόνιο μετά την εισαγωγή ή τη διαγραφή διαβάζεται λανθασμένα κατά τη μετάφραση [118]

### 4.3.2 Ακτίνες Χ

HerG2 εκτέθηκαν σε χαμηλής LET (0.3–3.0 keV/μm) ακτίνες-Χ με πηγή Gulmay X-ray RS225 (X-Strahl, Surrey, UK) στην Κολωνία. Ο σωλήνας των ακτίνων-Χ ήταν ρυθμισμένος στα 200 kV και στα 15 mA. Για τον περιορισμό των μαλακών ακτίνων-Χ παρεμβλήθηκε ένα φίλτρο Χαλκού, πάχους 0.5mm. Η δόση και ο ρυθμός δόσης προσδιορίστηκαν με το δοσίμετρο UNIDOSwebline, με θάλαμο ιονισμού τον TM30013 (PTW, Freiburg, Germany). Η απόσταση μεταξύ του δείγματος και την πηγής τέθηκε στα 450mm, ώστε να επιτευχθεί σταθερός ρυθμός δόσης στα 1.0 Gy/min. Μετά την έκθεση τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο θάλαμο επώασης. Καθώς η πηγή ακτίνων-Χ ήταν τοποθετημένη επάνω από τα δείγματα τα κύτταρα στις φλάσκες εκτέθηκαν σε οριζόντια θέση κάτω από το παράθυρο εξόδου των ακτίνων.

Κύτταρα A549, MO59K, MO59J ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες-Χ, σε πάγο, από πηγή (Seifert-Pantak, East Haven, CT) ρυθμισμένη στα 320 kV, 10mA, φέρουσα φίλτρο Αλουμινίου πάχους 1.65- mm (δραστικής ενέργειας φωτονίων 80 keV). Ο ρυθμός της δόσης για την απόσταση των 50 cm που τοποθετούνταν τα δείγματα ήταν στα 3 Gy/min. Η δοσιμετρία της πηγής είχε γίνει με θάλαμο ιονισμού και με ένα χημικό δοσίμετρο. Η μέση LET για αυτού του είδους την ακτινοβολία είναι περίπου 2 keV/μm.

Για τη μελέτη των ομαδοποιημένων βλαβών δοκιμάσαμε να ακτινοβολήσουμε τα κύτταρα A549 κατά λωρίδες για να μπορέσουμε να διακρίνουμε ενεχόμενες τοπικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών επιδιόρθωσης βλαβών βάσεων. Για το σκοπό αυτόν, εκθέσαμε και πάλι τα κύτταρα στην ίδια πηγή, αλλά πάνω από αυτά τοποθετήθηκε μεταλλική μάσκα φέρουσα παράλληλες εγκοπές πάχους 2 μm (2μ GaAs; Micro Leman X-ray collimator, Geneva, Switzerland). Η ακτινοβολήση έγινε για 5 min, αλλά η δόση που πραγματικά απορροφήθηκε δε μπορεί να υπολογιστεί εύκολα, άλλωστε δεν έχει ιδιαίτερη σημασία για το συγκεκριμένο πείραμα.

### 4.3.3 σωματια-α

Κύτταρα A549 εκτέθηκαν σε σωματια-α, εκπνεόμενα από πηγή <sup>241</sup>Am (Amersham) στο Ινστιτούτο Ιατρικής Ραδιοβιολογίας, στο Έσσεν της Γερμανίας. Η πηγή έχει κατασκευαστεί από το ίδιο το εργαστήριο και αποτελείται από δύο κυλινδρικούς θαλάμους από Αλουμίνιο, εκ των οποίων στον ένα τοποθετούνται τα προς ακτινοβολήση κύτταρα και ο άλλος περιέχει την πηγή και τον κατευθυντήρα. Οι θάλαμοι διαχωρίζονται από φύλλο πολυεστέρα, πάχους 1,5 μm που καλύπτει ένα παράθυρο διαμέτρου 50 mm. Ο θάλαμος της πηγής, όταν πρόκειται για ακτινοβολήση γεμίζεται με αέριο Ήλιον, ο άλλος

περιέχει ατμοσφαιρικό αέρα. Οι συνήθεις πηγές σωματιδίων-α περιλαμβάνουν τη δημιουργία κενού, ώστε να αποφεύγονται απώλειες ενέργειας από ανελαστικές σκεδάσεις των σωματιδίων-α με τα μόρια του αέρα. Η συγκεκριμένη πηγή όμως έχει την καινοτομία της πλήρωσής της με Ήλιο, ώστε οι όποιες σκεδάσεις να είναι ελαστικές, αφού τα μόρια He και τα σωματίδια-α έχουν πρακτικά την ίδια μάζα. Η ανάγκη για το αέριο Ήλιο προέκυψε καθώς η δημιουργία κενού προκαλούσε τη θραύση του λεπτού φύλλου πολυεστέρα που χωρίζει τους δύο θαλάμους. Η πηγή του  $^{241}\text{Am}$ , ενεργότητας  $1,2 \times 10^8$  Bq, τοποθετήθηκε ως  $\text{Am}_2\text{O}_3$  σε ένα φύλλο Αργύρου, και καλύφθηκε με μία στρώση Χρυσού, πάχους 2  $\mu\text{m}$ . Μετρήσεις βαθμονόμησης έδωσαν ρυθμό δόσης στα 79 Gy/h ή 1,32 Gy/min και μέση LET  $\sim 116$  keV/ $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.4 *Ιόντα Αργού*

Κύτταρα HepG2 εκτέθηκαν σε ιόντα Αργού,  $^{36}\text{Ar}$ , ενέργειας 95 MeV/n και η ενέργεια που φτάνει στο στόχο ήταν 84.7 MeV/n, LET  $\sim 270$  keV/ $\mu\text{m}$  στο Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL, Caen, France). Τα πλακάκια-φλάσκες πάνω στα οποία ήταν καλλιεργημένα τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν σε όρθια θέση. Για να γίνει η ακτινοβολήση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ειδικές θήκες, χωρητικότητας έξι δειγμάτων έκαστη, οι οποίες τοποθετήθηκαν επί του ειδικού μεταφορέα, ο οποίος οδήγησε τα δείγματα μπροστά στη δέσμη των σωματιδίων. Καθώς η ρύθμιση της θερμοκρασίας δεν είναι εφικτή στη συγκεκριμένη εγκατάσταση, η ακτινοβολήση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου. Ο χρόνος ακτινοβολήσης ήταν εξαρτώμενος από τη δόση, με μέγιστο των 10 min. Συνολικά η διαδικασία ακτινοβολήσης όλων των δειγμάτων διήρκεσε 20-30 min. Ο ρυθμός δόσης είχε τεθεί στο 1 Gy/min. Η ροή (P) των βαρέων ιόντων (σωματίδια/ $\text{cm}^2$ ,  $\Sigma/\text{cm}^2$ ) μετατράπηκε σε απορροφούμενη δόση σε Gy, σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση, λαμβάνοντας υπόψη τη γραμμική εναπόθεση ενέργειας (LET) για το είδος των σωματιδίων:

$$\text{Δόση (Gy)} = 1.6 \times 10^{-9} \times \text{LET (keV}/\mu\text{m}) \times P (\Sigma/\text{cm}^2) \quad (1)$$

Ο αριθμός των ακτινοβολημένων κυττάρων και ο μέσος αριθμός κρούσεων ανά κύτταρο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4-1**

Για τον υπολογισμό των παραμέτρων του **Πίνακα 4-1** θεωρήθηκε ότι η επιφάνεια του πυρήνα των HepG2 κυττάρων είναι 98  $\mu\text{m}^2$ . Ο υπολογισμός αυτής της επιφάνειας επεξηγείται στο επόμενο κεφάλαιο της διατριβής.

Πίνακας 4-1: Παράμετροι της εκθέσεως σε ιόντα Αργού, για τα κύτταρα HepG2

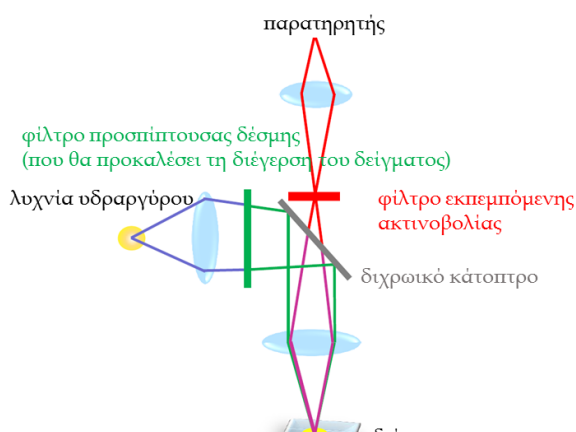
Ροή ( $\Sigma/\text{cm}^2$ )	Δόση (Gy)	Κλάσμα ανέπαφων κυττάρων	Κλάσμα κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν	Μέσος όρος κρούσεων
$0,00 \times 10^0$	0	1,0	0,1	0,0
$2,50 \times 10^5$	0,1	0,8	0,2	0,2
$1,25 \times 10^6$	0,5	0,3	0,7	1,2
$2,50 \times 10^6$	1,1	0,1	0,9	2,4
$5,00 \times 10^6$	2,2	0,0	1,0	4,9

#### 4.4 Απεικόνιση

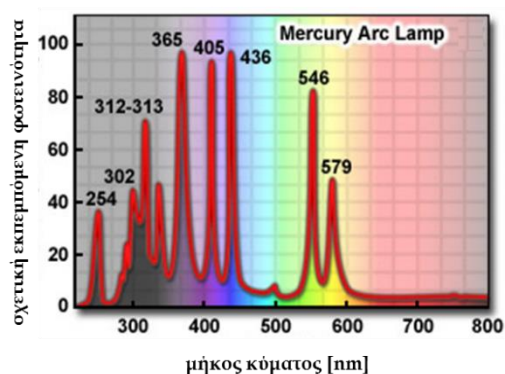
Για της ανάγκες τις παρούσας διατριβής έγινε χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά μικροσκόπια φθορισμού. Τα πειράματα που εκτελέστηκαν στο Ινστιτούτο Υγειοφυσικής στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» απεικονίστηκαν με το μικροσκόπιο επιφθορισμού AxioPlan 2 της εταιρίας Carl Zeiss Microscopy GmbH, Hamburg, Germany. Η λήψη των εικόνων έγινε με το λογισμικό ISIS της Metasystems.

Στα πειράματα που εκτελέστηκαν στο Ινστιτούτο Ιατρικής Ακτινοβιολογίας στο Έσσην της Γερμανίας, η απεικόνιση έγινε με το συνεστιακό μικροσκόπιο DMI6000B TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). και η λήψη των εικόνων έγινε με το σύστημα απεικόνισης που συνοδεύει το μικροσκόπιο, LAS AF της Leica Microsystems.

##### 4.4.1 Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίας επιφθορισμού



Σχήμα 4-3: Βασική αρχή λειτουργίας μικροσκοπίας φθορισμού



Σχήμα 4-2: Φάσμα εκπομπής της λυχνίας Υδραργύρου

Στη μικροσκοπία επιφθορισμού (ανάκλασης) (Σχήμα 4-2), η δέσμη εξέρχεται συνήθως από μία λυχνία ατμών μετάλλου (Υδραργύρου, ή Ξένου), και περιλαμβάνει πολλά μήκη

κύματος (Σχήμα 4-3). Φτάνοντας η πολυχρωματική δέσμη στο φίλτρο προσπίπτουσας δέσμης, μόνο μια μικρή περιοχή του φάσματος διέρχεται, προσπίπτει σε ένα διχρωμικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς το δείγμα. Φτάνοντας στο δείγμα, το διεγείρει, και η υπόλοιπη μαζί με την εκπεμπόμενη από το δείγμα ακτινοβολία (σήμα φθορισμού) επιστρέφει στο διχρωμικό κάτοπτρο, όπου αποκόπτονται τα μήκη κύματος της προσπίπτουσας δέσμης που επέστρεψαν λόγω ανάκλασης. Η υπόλοιπη δέσμη χρειάζεται να περάσει και από ένα δεύτερο φίλτρο, το φίλτρο εκπεμπόμενης ακτινοβολίας, καθώς το σήμα φθορισμού δεν είναι μονοχρωματικό. Στον επιθφορισμό, κάθε στιγμή φωτίζεται όλο το δείγμα και οι φωτογραφίες που λαμβάνονται αφορούν ολόκληρο το δείγμα (ένα εστιακό επίπεδο).

#### **4.4.2 Απεικόνιση με το μικροσκόπιο επιφθορισμού**

Το μικροσκόπιο επιφθορισμού που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διατριβής και που βρίσκεται στο Ινστιτούτο Υγιοφυσικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» είναι το AxioPlan 2 της εταιρίας Carl Zeiss και συνοδεύεται από το λογισμικό ISIS της Metasystems.

Για την απεικόνιση με το συγκεκριμένο λογισμικό απαιτήθηκαν κάποιες ρυθμίσεις ώστε οι εξαγόμενες εικόνες να είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους. Συγκεκριμένα η αυτόματη λήψη εικόνας που παρέχει το λογισμικό, εφαρμόζει αλγορίθμους κατάλληλους ώστε να κάνει ορατό το και το ελάχιστο σήμα, επομένως εξαρτά το χρόνο συλλογής σήματος από κάποια τιμή κορεσμού, την οποία μπορεί να επιλέξει ο χρήστης.

Για τις ανάγκες όμως της παρούσας εργασίας, χρειάστηκε να οριστούν καθορισμένοι χρόνοι συλλογής σήματος για το κάθε χρώμα, ώστε οι εικόνες από το ίδιο πείραμα να είναι μεταξύ τους συγκρίσιμες.

#### **Καθορισμός συνθηκών λήψης για το κάθε κανάλι**

Από τις ρυθμίσεις επιλέγουμε το εικονίδιο με το κίτρινο γρανάτζι (δεξί κλικ)

Επιλέγουμε “Fluorochrome Settings”

Για το αντίστοιχο φίλτρο που ενδιαφερόμαστε, π.χ. DAPI δημιουργούμε ένα αντίγραφο και το ονομάζουμε ‘DAPIfixed’.

Τα προκαθορισμένα φίλτρα είναι ρυθμισμένα για αυτόματη λήψη, αλλά ενδιαφερόμαστε για μη αυτόματη λήψη, επομένως από το πλαίσιο “Intergration time” από-επιλέγουμε το “Automatic” και ρυθμίζουμε το χρόνο συλλογής φωτός “Intergration time” στην επιθυμητή τιμή.

Επιθυμητή είναι η τιμή που προκύπτει από αλληπάλληλες δοκιμές, για ένα συγκεκριμένο πείραμα, και ορίζεται για το κάθε χρώμα, από την πειραματική συνθήκη που εμφάνισε το υψηλότερο σήμα στο αντίστοιχο χρώμα. Επομένως πριν αρχίσουμε να ρυθμίζουμε το λογισμικό απεικόνισης απαιτείται να ελέγξουμε όλα μας τα πλακάκια. Ο κορεσμός γίνεται αντιληπτός, καθώς στην ασπρόμαυρη εικόνα κατά τη διάρκεια τις λήψεις, οι περιοχές που έχουν κορεσμό εμφανίζονται από το λογισμικό κόκκινες.

### **Καθορισμός προγράμματος λήψης εικόνας**

Αφού ρυθμιστούν τα επιμέρους κανάλια, χρειάζεται να τα περάσουμε σε ένα πρόγραμμα λήψης:

Από τις ρυθμίσεις επιλέγουμε το εικονίδιο με το κίτρινο γρανάζι (δεξί κλικ)

Επιλέγουμε “Experiment type settings”.

Ανάλογα με το είδος του πειράματος που έχουμε να απεικονίσουμε, αν για παράδειγμα έχει τρία χρώματα, μπλε, πράσινο και κόκκινο, επιλέγουμε το αντίστοιχο προκαθορισμένο πρόγραμμα (BGR εν προκειμένω) και δημιουργούμε ένα αντίγραφο του πατώντας το πλήκτρο ‘+’.

Έτσι έχουμε δημιουργήσει ένα νέο πρόγραμμα λήψης, όπου για ευκολία το έχουμε ορίσει με βάση ένα παρόμοιο που προϋπάρχει.

Για να περάσουμε σε αυτό τα κανάλια που προκαθορίσαμε στο επόμενο βήμα, στο πλαίσιο “capture sequence” αντικαθιστούμε τα υπάρχοντα κανάλια, με τα νέα που έχουμε ορίσει. Στο πλαίσιο ‘Integration time’, στο πεδίο ‘Capture’ επιλέγουμε ‘Individual’ και τέλος πατάμε ‘OK’.



Εικόνα 4-1:  
Λεπτομέρεια από το  
λογισμικό Isis  
Metasystems

Επιπλέον, το λογισμικό παρέχει τις εξής δυνατότητες για τη βελτίωση της εικόνας.

Όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της **Εικόνας 4-1**, το λογισμικό έχει αναλύσει την εικόνα για το κόκκινο χρώμα, σε ένα ιστόγραμμα συχνοτήτων, όπου στον κατακόρυφο άξονα είναι ο αριθμός των pixel και στον οριζόντιο οι τιμές της έντασης από 0 έως 255 (8-bit).

#### **Lower Threshold**

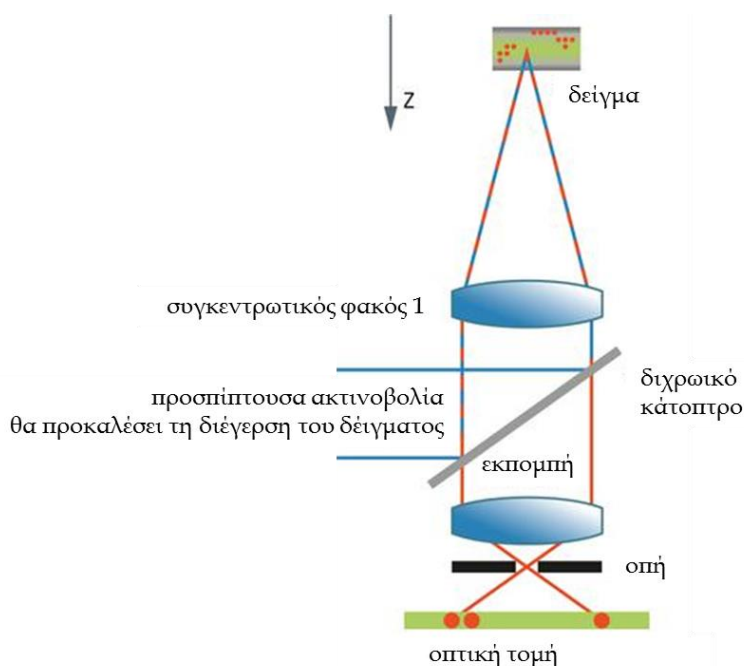
Με την επιλογή Lower Threshold μπορούμε να μετακινήσουμε από αριστερά προς τα δεξιά την πρώτη άσπρη κάθετη γραμμή που φαίνεται στο κάτω πλαίσιο, στο ιστόγραμμα συχνοτήτων. Εάν δεν κάνουμε τίποτα η γραμμή αυτή βρίσκεται στο μηδέν. Μετακινώντας τη δεξιά, από την εικόνα σβήνονται όσα pixel έχουν ένταση μικρότερη από την ένταση στην οποία έχουμε μετακινήσει τη γραμμή αυτή. Δηλαδή με αυτήν την εντολή καθαρίζουμε την εικόνα από το υπόβαθρο.

#### **Upper threshold**

Με την επιλογή Upper threshold μετακινούμε από δεξιά προς τα αριστερά, τη δεύτερη άσπρη γραμμή που φαίνεται στο διάγραμμα συχνοτήτων. Εάν δεν τη μετακινήσουμε, βρίσκεται στην τιμή 255. Όσο τη μετακινούμε μεταβάλλεται η φωτεινότητα σε όλα τα pixel της εικόνας. Αυξάνεται η φωτεινότητα σε όλα τα pixel τόσο περισσότερο όσο μετακινούμε προς τα αριστερά το Upper threshold. Εφόσον φτάσουμε σε σημείο ύπαρξης κορεσμού, τότε τα pixel που ήδη έχουν φτάσει δε μεταβάλλονται άλλο, αλλά αυξάνουν τη φωτεινότητά τους όλα τα υπόλοιπα. Επομένως την εντολή Upper threshold τη χρησιμοποιούμε όταν θέλουμε να τονίσουμε λεπτομέρειες μιας εικόνας, αυξάνοντας τη φωτεινότητά τους.



### 4.4.3 Συνεστιακή μικροσκοπία



Σχήμα 4-4: Βασική αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας

Στη συνεστιακή μικροσκοπία υπάρχει η δυνατότητα απεικόνισης πολλών εστιακών επιπέδων του ίδιου οπτικού πεδίου. Η βασική διαφορά που έχει με την απλή μικροσκοπία φθορισμού, είναι ότι στην πορεία της εκπεμπόμενης δέσμης παρεμβάλλεται ένα διάφραγμα που αφήνει το σήμα να περάσει από μία μικρή οπή. Στη συνεστιακή μικροσκοπία, σε αντίθεση με τον επιφθορισμό, το σήμα κάθε στιγμή προέρχεται μόνο από μία μικρή περιοχή του δείγματος. Αυτό ακριβώς εξασφαλίζει η ύπαρξη της οπής, ότι θα περάσει μόνο το σήμα που προέρχεται από μία μικρή περιοχή και όχι ανεστίαστο σήμα από άλλα εστιακά βάθη. Επομένως για να συντεθεί μία εικόνα χρειάζεται επεξεργασία από υπολογιστή, αφού κάθε στιγμή της απεικόνισης συλλέγεται η πληροφορία που καταχωρείται σε ένα pixel. Όταν σαρωθεί ένα εστιακό επίπεδο, υπάρχει η δυνατότητα για το ίδιο οπτικό πεδίο να σαρωθούν και άλλα εστιακά επίπεδα. Με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών γίνεται η τρισδιάστατη απεικόνιση, δημιουργούμενη από τις διάφορες τομές.

#### Απεικόνιση με το συνεστιακό μικροσκόπιο

Στο **Παράρτημα Α6** της διατριβής δίνονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθούνται για την απεικόνιση με το συγκεκριμένο μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής.

## 4.5 Πρωτόκολλο χρώσης

Για τις μετρήσεις εστιών  $\gamma$ -H2AX έγιναν πολλές σειρές πειραμάτων μέχρι να προσδιοριστεί το κατάλληλο πρωτόκολλο, σε συνεργασία με τη δρα Βασιλική Χατζή. Το πρωτόκολλο στο οποίο καταλήξαμε έχει ως εξής:

Σε ακτινοβολημένα κύτταρα MCF7, τα οποία είχαμε σπείρει πάνω σε πλακίδια μικροσκοπίου, έχοντας ορίσει μία περιοχή με υδρόφοβο μαρκαδόρο, αφού επωάζονταν για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα που απαιτούσε το εκάστοτε πείραμα (0,5 , 1, 6, 12, 48 ή 72 h) γινόταν μονιμοποίηση με βύθιση σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4 % (w/v) για 20 min.

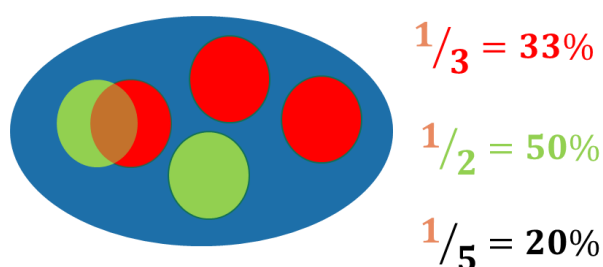
## 4.6 Μέθοδοι εκτίμησης του συνεντοπισμού

Στη μικροσκοπία φθορισμού, ο συνεντοπισμός (colocalization) αναφέρεται στη χωρική επικάλυψη μεταξύ δύο ή περισσότερων φθορίζοντων ιχνηθετών. Οι φθορίζοντες ιχνηθέτες για να παρέχουν πληροφορία απαιτείται να έχουν διαφορετικό μήκος κύματος απορρόφησης καθώς και διαφορετικό μήκος κύματος εκπομπής ώστε να μπορεί να διακριθεί εάν οι διαφορετικοί «στόχοι» βρίσκονται στην ίδια περιοχή του κυττάρου ή έστω εάν βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους. Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει δύο διαφορετικά φαινόμενα, τη λεγόμενη συνεμφάνιση (co-occurrence), η οποία αναφέρεται στην εμφάνιση δύο διαφορετικών (πιθανώς μη σχετιζόμενων) φθοροφόρων στο ίδιο pixel και τη συσχέτιση (correlation) που εκφράζει μία πολύ περισσότερο στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ των φθοροφόρων, δηλωτικής κάποιας βιολογικής αλληλεπίδρασης [119].

Στην περίπτωση αυτή η ενδεχόμενη φυσική χωροχρονική συνύπαρξη δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών σε έναν μικρό όγκο του κυττάρου (συνήθως της τάξεως των  $0,1-10 \mu\text{m}^3$ ) θα έχει ως αποτέλεσμα την επικάλυψη των σημάτων φθορισμού. Ο φθορισμός προέρχεται από τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για να στοχεύσουν τα πρωτεύοντα αντισώματα, τα οποία με τη σειρά τους στοχεύουν τις προς ανίχνευση πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA. Γίνεται η παραδοχή ότι τα μη επισημασμένα πρωτεύοντα αντισώματα προσδένονται επιλεκτικά στα μόρια στόχους, καθώς και ότι στα πρωτεύοντα αντισώματα προσδένονται τα επισημασμένα δευτερεύοντα, τα οποία φέρουν κάποια φθορίζουσα χρωστική, που συνήθως εκπέμπει στο μπλε, το κόκκινο ή το πράσινο του οπτικού φάσματος. Για τη διέγερση της φθορίζουσας ουσίας απαιτείται το κατάλληλο μήκος κύματος το οποίο οφείλει να διαφέρει από το μήκος κύματος διέγερσης των άλλων

χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο ίδιο πείραμα, ώστε να διακρίνονται μεταξύ τους οι προς ανίχνευση ουσίες.

Ακολουθεί η ανάλυση της εικόνας σύμφωνα με την ένταση του κάθε χρώματος στο ίδιο pixel ή voxel. Όποια μέθοδος και αν ακολουθηθεί, σίγουρα υπάρχει η τοπολογία του εικονοστοιχείου, όπου εκεί εξετάζονται οι εντάσεις [4]. Παλαιότερες μελέτες χρησιμοποιούν αυτήν τη λογική για να αποφανθούν για τη συνεμφάνιση πρωτεϊνών ή άλλων βιολογικών μορίων. Πολύ κοινά χρησιμοποιούμενοι συντελεστές είναι ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (Pearson's correlation coefficient -PCC) και ο συντελεστής επικάλυψης του Manders (Manders' overlap coefficient -MOC) [120]. Και οι δύο αυτές προσεγγίσεις λαμβάνουν την εικόνα ως σύνολο, παρέχοντας για κάθε μία εικόνα έναν μόνον αριθμό, οπότε δε λαμβάνεται υπόψη ούτε η τοπολογία του κυττάρου ούτε βεβαίως και η τοπολογία των εστιών φθορισμού, που είναι κυρίαρχη μεταξύ των ερευνητών που ασχολούνται με τις βλάβες του DNA, οπτικοποιούμενες μέσω του ανοσοφθορισμού. Αυτές οι προσεγγίσεις λοιπόν παρέχουν ως αποτέλεσμα κάποιο ποσοστό συνεντοπισμού όπου δεν εκφράζει τις εστίες φθορισμού. Κάποια βελτίωση αυτών των παραμέτρων εισήγαγαν οι Costes et al [121], επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αληθούς συνεντοπισμού σε εικόνες που είχαν έως και 3% συνεντοπισμό. Αυτός ο τελευταίος αλγόριθμος αργότερα υιοθετήθηκε και από την πολύ γνωστό λογισμικό ImarisColoc (Bitplane: <http://www.bitplane.com/imaris/imariscoloc>). Ειδικότερα για την εκτίμηση βλαβών DNA έχουν διατυπωθεί και άλλες απλούστερες προσεγγίσεις [122-124]. Η κύρια ιδέα γύρω από το συνεντοπισμό είναι πάντα να εκφραστεί ο βαθμός επικάλυψης των σημάτων που προέρχονται από δύο ή περισσότερα κανάλια σε μία εικόνα μικροσκοπίου. Η πιο κοινή βεβαίως θεώρηση του συνεντοπισμού, η οποία περιλαμβάνει την τοπολογία



Σχήμα 4-5: Σχηματική αναπαράσταση της κλασσικής θεώρησης συνεντοπισμού μεταξύ των εστιών φθορισμού. Ως αποτέλεσμα, ανά κύτταρο, λαμβάνεται το κλάσμα των συμβάντων συνεντοπισμού προς τον αριθμό εστιών της μιας ή της άλλης χρωστικής, ή ως προς τον ολικό αριθμό εστιών.

των εστιών φθορισμού, είναι η έκφραση σε ποσοστό των συνεντοπισμένων εστιών ως προς τον αρχικό αριθμό εστιών της μιας ή της άλλης χρωστικής, ή ως προς το σύνολο των εστιών. Η θεώρηση αυτή είναι πολύ βολική διότι η διατύπωση του κλάσματος κάνει άμεσα αντιληπτή την ισχύ του φαινομένου. Ωστόσο αυτή η μέθοδος δίνει καλά αποτελέσματα, στην περίπτωση που οι εστίες είναι

καλοσχηματισμένες, ισομεγέθεις και ο πληθυσμός τους είναι όχι ιδιαίτερος μεγάλος. Αν

δεν πληρούνται αυτά τα κριτήρια τότε είτε η διατύπωση δε γίνεται με ασφάλεια, είτε το συμπέρασμα που μπορεί να προκύψει περιέχει αβεβαιότητα. Πριν αναφερθούμε στη μέθοδο που εμείς εισαγάγαμε, παρουσιάζεται εδώ μία ακόμη προσέγγιση, αυτή της συνεργάτιδάς μας Olga Martin.

Οι Olga Martin et al. εισήγαγαν την παράμετρο  $R_{col}$  για να περιγράψει το συνεντοπισμό μεταξύ εστιών παρόμοιου μεγέθους και αριθμού:

$$R_{col} = \frac{2I_{53BP1}}{I_{\gamma H2AX} + I_{53BP1}} \quad (1)$$

όπου  $R_{col}$  είναι ο λόγος συνεντοπισμού,  $I_{53BP1}$  και  $I_{\gamma H2AX}$  είναι οι μέσες εντάσεις φθορισμού για τα κανάλια που αποτυπώνουν τις πρωτεΐνες 53BP1 και  $\gamma$ -H2AX αντίστοιχα, για μία δεδομένη εστία φθορισμού  $\gamma$ -H2AX, κανονικοποιημένες, ως προς ολόκληρη την εικόνα. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι παρουσιάζει ένα σταθερό εύρος τιμών από το 0 έως το 1 [124]. Η τιμή 0 λαμβάνεται στην περίπτωση που δεν υπάρχει σήμα προερχόμενο από την 53BP1, και η τιμή 1 στην περίπτωση που τα επίπεδα φθορισμού των δύο δεικτών είναι τα ίδια, στην περιοχή που καταλαμβάνει μία δεδομένη εστία  $\gamma$ -H2AX. Αυτή η προσέγγιση είναι λοιπόν βολική σε περιπτώσεις, όπως για εκείνη για την οποία ορίστηκε αυτός ο συντελεστής, όταν δηλαδή πρόκειται για δύο δείκτες δίκλωνων θραύσεων (53BP1 και  $\gamma$ -H2AX), όπου δεν υπάρχει αμφιβολία ότι όντως εμφανίζουν συνεντοπισμό οι προς εξέταση πρωτεΐνες και έτσι δε χρειάζονται επιχειρήματα βασιζόμενα στην ανάλυση της εικόνας.

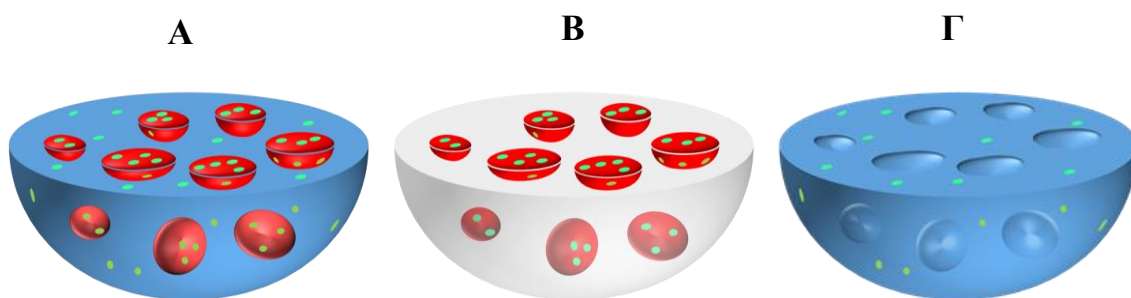
Εάν όμως με αυτήν την προσέγγιση γίνει προσπάθεια να αναλυθούν εικόνες όπως αυτή της **Εικόνας 5-3**, όπου το πράσινο χρώμα παρουσιάζει διάχυτη χρώση, ο συντελεστής αυτός, εάν εξεταστεί βασιζόμενος στις κόκκινες εστίες (εστίες δίκλωνων θραύσεων) θα βγάλει μία τιμή κοντά στο 1, χωρίς όμως να παρέχει κάποιο κριτήριο που να εξασφαλίζει ότι πρόκειται για αληθή συνεντοπισμό και όχι για τυχαίο. Στο πράσινο χρώμα θεωρούμε κάποια πρωτεΐνη που να επιδιορθώνει βλάβες βάσεων όπως την APE1 ή την OGG1.

$$R_{col} = \frac{2I_{OGG1}}{I_{\gamma H2AX} + I_{OGG1}} \quad (2)$$

Με τον όρο τυχαίο συνεντοπισμό γίνεται αναφορά στην ύπαρξη εστιών που αναφέρονται σε βλάβες που δεν είναι ΔΚΘ, επάνω στις εστίες των δίκλωνων θραύσεων οι οποίες είτε προέρχονται από το ενδογενές οξειδωτικό στρες, είτε απλώς απεικονίζουν την ενδογενή συγκέντρωση αυτής της πρωτεΐνης.

Επομένως και εάν ακόμα η σχέση (2) έχει σαν αποτέλεσμα τιμές κοντά στο 1, αυτό δεν έχει εξασφαλίσει ότι όντως υπάρχει διαφορά στη χρώση του πράσινου χρώματος μεταξύ των περιοχών της εστίας της ΔΚΘ και του υπόλοιπου του πυρήνα. Δηλαδή η μέγιστη τιμή του  $R_{col}$  που είναι το 1, δεν εξασφαλίζει ότι και ο υπόλοιπος πυρήνας μπορεί να είναι και αυτός βαμμένος με το πράσινο χρώμα.

Για να γίνει εφικτή η ανάλυση αυτού του είδους των εικόνων, αρχικά προτάθηκε από εμάς μία παράμετρος, η  $F_{like}$ , οποία συγκρίνει τον αριθμό των μικρών (πράσινων εδώ) εστιών στις μεγάλες (κόκκινες εδώ) εστίες των ΔΚΘ, με τον αριθμό των μικρών εστιών, στο υπόλοιπο του πυρήνα του κυττάρου. Η ονομασία  $F_{like}$ , προέρχεται από το «Foci-like», επειδή σε αυτήν την παράμετρο, και τα δύο αντισώματα θεωρούμε ότι σχηματίζουν εστίες φθορισμού (foci). Στη συνέχεια προτείναμε και την παράμετρο  $P_{clcr}$  η οποία είναι περισσότερο ακριβής. Και οι δύο αυτές παράμετροι έχουν δημοσιευτεί [125, 126].



Σχήμα 4-6: Τοπολογία ορισμού των παραμέτρων  $F_{like}$  και  $P_{clc}$  που εισαγάγαμε για την καλύτερη εκτίμηση του συνεντοπισμού. Α) ολόκληρος ο πυρήνας του κυττάρου, με τις μεγάλες εστίες (εδώ με κόκκινο χρώμα) να αντιπροσωπεύουν τις δίκλωνες θραύσεις και τις μικρές (εδώ πράσινες εστίες) να αντιπροσωπεύουν τις βλάβες βάσεων. Β) η περιοχή στην οποία αναφέρονται οι ποσότητες που βρίσκονται στον αριθμητή των παραμέτρων  $F_{like}$  και  $P_{clc}$ . Γ) η περιοχή στην οποία αναφέρονται οι ποσότητες που βρίσκονται στον παρονομαστή των παραμέτρων  $F_{like}$  και  $P_{clc}$ .

Στο **Σχήμα 4-6** παρουσιάζονται οι γεωμετρικοί τόποι των περιοχών στις οποίες αναφέρονται. Στο μέρος Α) παρουσιάζεται ολόκληρος ο πυρήνας του κυττάρου, με μπλε χρώμα, όπου επίσης υπάρχουν οι μεγάλες (κόκκινες εδώ) εστίες που αντιπροσωπεύουν τις ΔΚΘ και οι μικρές (πράσινες εδώ) εστίες που αντιπροσωπεύουν βλάβες βάσεων. Στο μέρος Β) ο θεωρούμενος χώρος είναι μόνο ο χώρος των μεγάλων (κόκκινων) εστιών, και στο μέρος Γ) ο θεωρούμενος χώρος είναι το υπόλοιπο του πυρήνα του κυττάρου, δηλαδή ο πυρήνας, εάν αφαιρεθούν οι όγκοι που καταλαμβάνουν οι μεγάλες (κόκκινες) εστίες. Οι δύο παράμετροι που εισαγάγαμε είναι χρήσιμες όταν πρόκειται για εστίες ανόμοιου μεγέθους, και ιδιαίτερως στην περίπτωση που οι μικρές εστίες παρουσιάζουν διάσπαρτη χρώση. Οι παράμετροι αυτές, προτείνονται κατά περίπτωση:

#### 4.6.1 Για την περίπτωση και οι δύο δείκτες παρουσιάζουν καλοσηματισμένες εστίες φθορισμού προτείνουμε την παράμετρο $F_{like}$ .

Η παράμετρος  $F_{like}$  προτείνεται όταν και οι δύο δείκτες παρουσιάζουν καλοσηματισμένες εστίες. Η παράμετρος αυτή εκφράζεται ως ο λόγος της χωρικής πυκνότητας των μικρών εστιών στην περιοχή των μεγάλων εστιών (Σχήμα 4-6<sup>B</sup>) προς τη χωρική πυκνότητα των μικρών εστιών στην υπόλοιπη περιοχή του πυρήνα, εάν εξαιρεθεί ο όγκος που καταλαμβάνουν οι μεγάλες (εδώ κόκκινες) εστίες (Σχήμα 4-6<sup>F</sup>).

Η παράμετρος  $F_{like}$  δίνεται από τις ισοδύναμες εκφράσεις στις εξισώσεις (3) και (4).

$$F_{like} = \frac{\text{χωρική πυκνότητα των μικρών εστιών στην περιοχή των εστιών των } \Delta K\Theta}{\text{χωρική πυκνότητα των μικρών εστιών στην υπόλοιπη περιοχή του πυρήνα}} \quad (3)$$

$$F_{like} = \frac{\frac{\# \text{ των μικρών εστιών επάνω στις εστίες των } \Delta K\Theta}{\text{συνολικός όγκος που καταλαμβάνουν οι εστίες των } \Delta K\Theta}}{\frac{\text{συνολικός } \# \text{ των μικρών εστιών σε όλον τον πυρήνα} - \# \text{ των μικρών εστιών πάνω στις εστίες των } \Delta K\Theta}{\text{όγκος του πυρήνα} - \text{τον όγκο των εστιών των } \Delta K\Theta}} \quad (4)$$

Η παράμετρος  $F_{like}$  τείνει στο 0 στην περίπτωση του αντίστροφου συνεντοπισμού, παίρνει τιμές γύρω στο 1 στην περίπτωση του τυχαίου συνεντοπισμού, και κάθε τιμή σημαντικά μεγαλύτερη του 1 δηλώνει τον αληθή συνεντοπισμό. Αυτή η προσέγγιση είναι βολική όταν και οι μικρές και οι μεγάλες εστίες είναι καλοσηματισμένες. Παρόλο που αυτή η θεώρηση είναι σχετικά απλή, καθώς η επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν απαιτεί ιδιαίτερα πολλές πράξεις, δεν είναι εφαρμόσιμη στην περίπτωση που η χρώση του ενός δείκτη είναι διάχυτη. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της ανάλυσης που εκφράζεται με την παράμετρο  $F_{like}$  είναι ότι η επιλογή των κριτηρίων για τον ορισμό των μικρών εστιών είναι πολύ επιρρεπής στις μικρές αλλαγές αυτών των κριτηρίων, παράγοντας μεγάλες διακυμάνσεις, ως προς το αριθμητικό αποτέλεσμα για τις μικρές εστίες, κάνοντας έτσι αυτήν τη διακύμανση να διαδίδεται και στην παράμετρο  $F_{like}$ . Για αυτήν την περίπτωση προτείνουμε την παράμετρο  $P_{clc}$ . Όπου η τοπολογία των μεγάλων εστιών διατηρείται, αλλά δεν υπάρχει η ανάγκη του καθορισμού των μικρών εστιών.

#### 4.6.2 Για την περίπτωση που μόνο ο δείκτης των $\Delta K\Theta$ παρουσιάζει καλοσηματισμένες εστίες φθορισμού προτείνουμε την παράμετρο $P_{clc}$ .

Για την περίπτωση που η χρώση του δείκτη για τις βλάβες βάσεων είναι διάχυτη και οι εστίες δε μπορούν να οριστούν με βεβαιότητα, ορίσαμε την παράμετρο  $P_{clc}$ . Εκφράζεται στην ίδια τοπολογία με την παράμετρο  $F_{like}$  μόνο που αντί στις θεωρούμενες περιοχές να λαμβάνεται η χωρική πυκνότητα των μικρών εστιών, η πληροφορία που εξετάζεται και

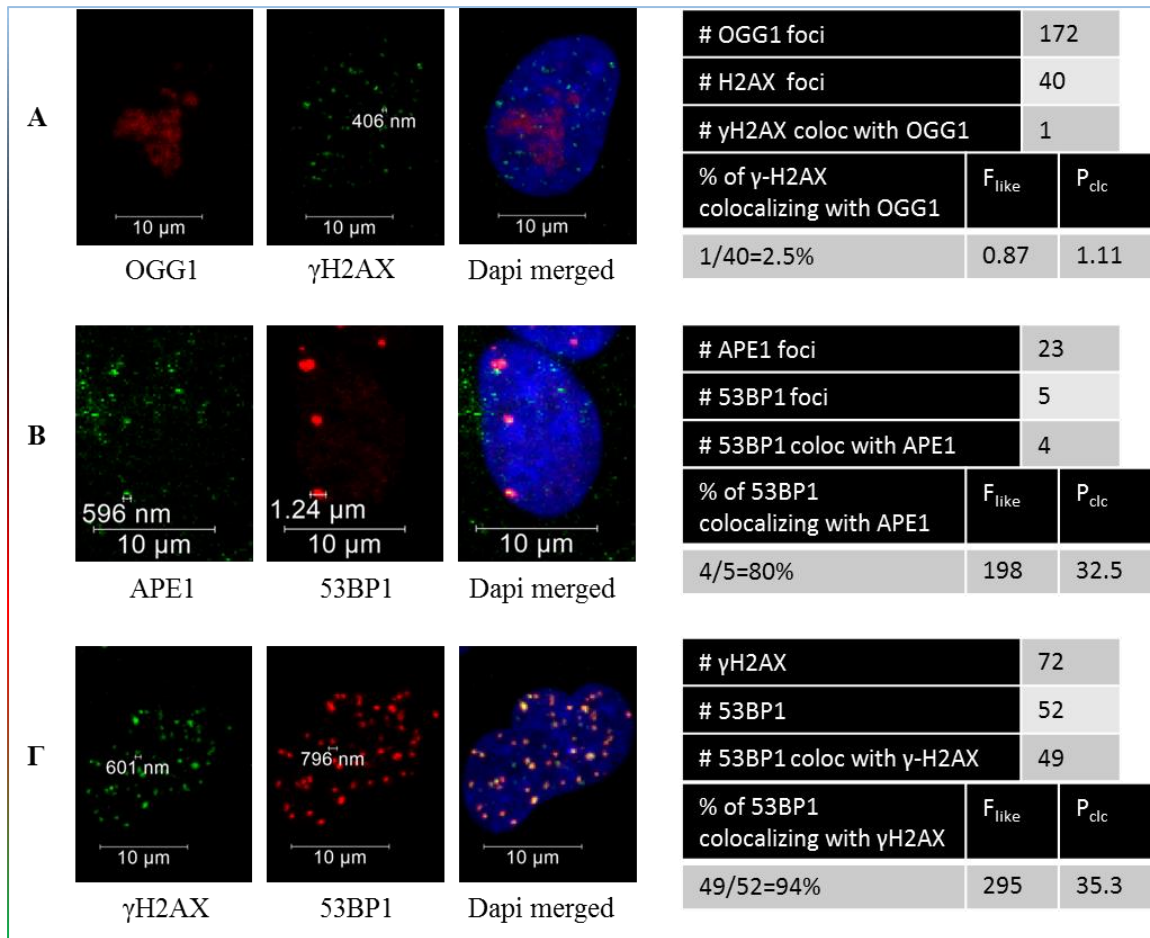
αφορά τη χρώση για τις βλάβες βάσεων είναι η μέση ένταση του φθορισμού στο αντίστοιχο κανάλι (εδώ στο πράσινο χρώμα). Διατυπώνεται με τις ισοδύναμες εκφράσεις των εξισώσεων (5) και (6).

$$P_{clc} = \frac{\text{Μ.Ο. της μέσης έντασης που εκδηλώνει κάθε εστία ΔΚΘ στο κανάλι των βλαβών βάσεων}}{\text{μέση ένταση του υπόλοιπου του πυρήνα στο κανάλι του χρώματος των βλαβών βάσεων}} \quad (5)$$

$$P_{clc} = \frac{\text{Μ.Ο. (μέσης έντασης στο πράσινο για την κόκκινη εστία}_i)}{\frac{\text{ολική ένταση στο πράσινο όλου του πυρήνα} - \sum_i \text{ολική ένταση στο πράσινο για την κόκκινη εστία}_i}{\text{όγκος του πυρήνα} - \sum_i \text{όγκος της κόκκινης εστίας}_i}} \quad (6)$$

Η έκφραση αυτή αφορά ένα κότταρο, και ο δείκτης  $i$  διατρέχει τις κόκκινες εστίες. Μ.Ο. ο μέσος όρος. Και σε αυτήν την προσέγγιση, οι τιμές της παραμέτρου  $P_{clc}$  που τείνουν στο 0 εκφράζουν ανάστροφο συνεντοπισμό, τιμές γύρω στη 1 εκφράζουν τυχαίο συνεντοπισμό, ενώ τιμές σημαντικά μεγαλύτερες του 1 εκφράζουν τον αληθή συνεντοπισμό.

Στην **Εικόνα 4-2** παρουσιάζονται παραδείγματα διαφόρων μεθόδων για την εκτίμηση του συνεντοπισμού μεταξύ πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA.



Εικόνα 4-2: Τρεις περιπτώσεις συνεντοπισμού, αυξανόμενοι από το Α στο Γ, και διάφορες μέθοδοι εκτίμησης. Α) ένα προκαταρκτικό πείραμα, όπου η χρώση του OGG1 για τις βλάβες βάσεων εμφανίζεται με τυχαίο τρόπο, Ο κλασικός συνεντοπισμός, με μορφή κλάσματος δε δίνει πληροφορία για το εάν πρόκειται για τυχαίο φαινόμενο ή όχι, ενώ και οι δύο παράμετροι  $F_{like}$  και  $P_{clc}$  που εισαγάγαμε δίνουν τιμή γύρω στο 1, δηλαδή πρόκειται για τυχαίο συνεντοπισμό. Β) Πείραμα μεταξύ της APE1 και της 53BP1. Ο κλασικός συνεντοπισμός δίνει μία τιμή γύρω στο 80% και οι δύο παράμετροι που εισαγάγαμε προτείνουν ότι πρόκειται για αληθή συνεντοπισμό. Γ) Συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών που ανιχνεύουν ΔΚΘ. Όλες οι παράμετροι βγαίνουν με τη μεγαλύτερη τιμή τους. Συνολικά από το σχήμα συνάγεται ότι και οι δυο παράμετροι που προτείναμε ανταποκρίνονται καλά σε όλα τα είδη των εικόνων.



## 4.7 Χρήση λογισμικού για τη συστηματική ανάλυση των εστιών φθορισμού

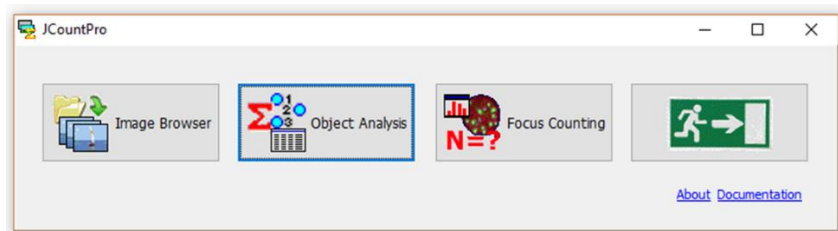
### 4.7.1 Ανάλυση εικόνων που προέρχονται από μικροσκόπιο επιφθορισμού

Όλα τα πειράματα που απεικονίστηκαν με το μικροσκόπιο επιφθορισμού αναλύθηκαν με κάποιο από τα διαθέσιμα λογισμικά που ανέπτυξε η ομάδα του συνεργάτη μας Pavel N. Lobachevsky από το PeterMacCallum Cancer Centre, East Melbourne. Το πρώτο λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν το Jcount [123]. Στη συνέχεια για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής και σε συνεργασία με εμάς ο Dr Lobachevsky το ανέπτυξε περαιτέρω δημιουργώντας τα JcountPro και JquantPro, ώστε να συμπεριλάβει την παράμετρο  $P_{dc}$  που εμείς ορίσαμε.

Στο **Παράρτημα** δίνονται μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με αυτό το πρώτο λογισμικό, το Jcount. Καθώς η λογική παραμένει η ίδια και τα επόμενα δύο πακέτα περιλαμβάνουν ότι περιλαμβάνει το Jcount αλλά και επιπλέον δυνατότητες, δε θα αναφερθούμε αναλυτικά σε αυτό, αλλά παραθέτουμε εδώ οδηγίες για το πώς γίνεται η ανάλυση των εικόνων με το JcountPro και το JquantPro. Το JcountPro μπορεί να σταθεί μόνο του ως λογισμικό, ενώ το JquantPro που δημιουργήθηκε κατόπιν δικού μας αιτήματος, χρειάζεται οι εικόνες να αναλυθούν σε πρώτο επίπεδο από το JcountPro, πριν αναλυθούν με το JquantPro.

Δύο είναι οι βασικές τοπολογικές οντότητες που ορίζονται μέσω αυτών των λογισμικών: οι πυρήνες των κυττάρων 'objects' και οι εστίες φθορισμού 'foci'. Ο χρήστης λοιπόν πριν προχωρήσει στην ανάλυση των εστιών φθορισμού, πρέπει πρώτα να οδηγήσει το λογισμικό ώστε να ανιχνεύσει τους πυρήνες των κυττάρων. Εδώ χρησιμοποιούμε για αυτόν τον πρώτο στόχο το λογισμικό JcountPro.

#### 4.7.1.1 Εύρεση των πυρήνων των κυττάρων -JcountPro



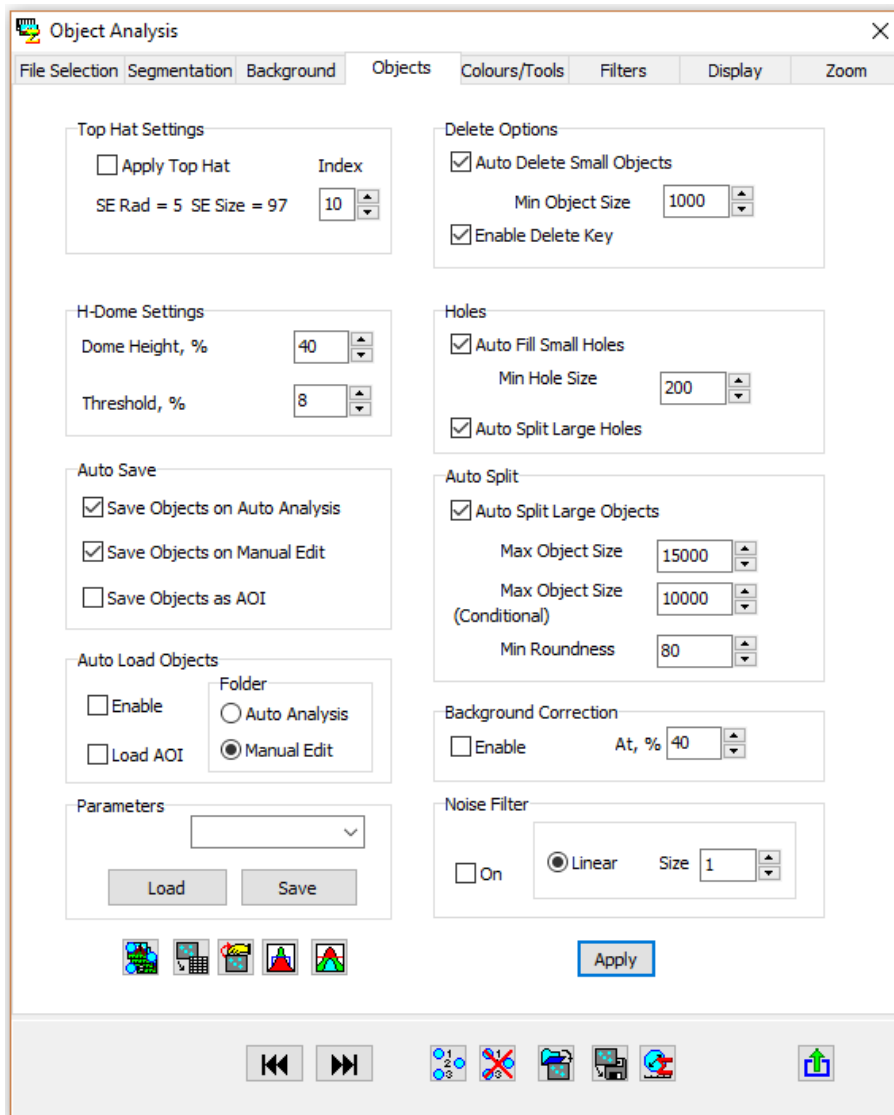
Εικόνα 4-3: Αρχικό μενού στο JcountPro. Για να ορίσουμε τους πυρήνες επιλέγουμε το 'Object Analysis'

Από το αρχικό μενού επιλέγουμε το Object Analysis (Εικόνα 4-3).

Στο αναδυόμενο παράθυρο (Εικόνα 4-4), η πρώτη καρτέλα είναι το 'File selection'. Επιλέγουμε τις προς ανάλυση εικόνες, οι οποίες πρέπει να είναι σε μορφή .tif χωρίς συμπίεση. Η μετατροπή των εικόνων σε .tif χωρίς συμπίεση μπορεί να γίνει με το ελεύθερο λογισμικό IrfanView.

Για να επιλέξουμε τις εικόνες πατάμε 'Add' και στη συνέχεια 'Display'.

Στην επόμενη καρτέλα 'Segmentation' επιλέγουμε το χρώμα που είναι βαμμένοι οι πυρήνες, στα δικά μας πειράματα είναι με DAPI, επομένως επιλέγουμε το 'blue' και από το 'row tune' πηγαίνουμε το δείκτη από τα δεξιά προς τα αριστερά ώστε να επιλεγούν οι πυρήνες. Ο δείκτης αντιστοιχεί στις εντάσεις των pixel, επομένως αρχικά επιλέγει τα pixel



Εικόνα 4-4: Ενδεικνύόμενες τιμές των επιμέρους παραμέτρων για την επιλογή των πυρήνων των κυττάρων, στο λογισμικό JcountPro.

με τη μεγαλύτερη ένταση και όσο κινούμαστε προς τα αριστερά επιλέγει και pixel μικρότερης έντασης.

Στην καρτέλα 'Objects' (**Εικόνα 4-4**), δίνεται η δυνατότητα να ορίσουμε τις παραμέτρους για την επιλογή των πυρήνων.

### **Top Hat Settings**

Στην ανάλυση εικόνας ένας πολύ κοινός μετασχηματισμός είναι η εντολή Top Hat. Με το Top Hat ενισχύονται λεπτομέρειες μιας εικόνας. Για την επιλογή των πυρήνων δεν είναι απαραίτητη, επομένως την εξηγούμε στα επόμενα.

Στο H-Dome αφήνουμε την προεπιλογή.

Στο AutoSave επιλέγουμε τα δύο πρώτα.

### **Delete Options**

Μία πολύ χρήσιμη επιλογή. Δεν επιλέγει τους πυρήνες που είναι μικρότεροι από τα καθορισμένα pixel. Ανάλογα με την ανάλυση της διαθέσιμης εικόνας, ορίζουμε τον αριθμό των pixel που είναι ο ελάχιστος επιτρεπτός. Κάθε αντικείμενο μικρότερο από αυτόν, διαγράφεται αυτόματα από την επιλογή.

### **Holes**

Πολλές φορές κατά τη χρώση με Dapi γίνονται ορατοί οι πυρηνίσκοι, ως σκοτεινές περιοχές μέσα στους μπλε πυρήνες. Το λογισμικό αντιλαμβάνεται τους πυρηνίσκους ως οπές. Εάν θέλουμε οι πυρηνίσκοι να μην εξαιρεθούν από τον πυρήνα του κυττάρου, επιλέγουμε το 'Auto Fill Small Holes'.

### **Auto Split**

*Max Object size*: το μέγιστο επιτρεπτό μέγεθος ενός πυρήνα. Αντικείμενα μεγαλύτερα από αυτό διαχωρίζονται.

*Max Object size (conditional)*: Η παράμετρος αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την *Min Roundness*. Εάν κάποιο αντικείμενο είναι μεγαλύτερο από αυτήν την τιμή και αντίστοιχα έχει μικρότερη «στρογγυλότητα» από το *Min Roundness*, τότε το αντικείμενο διαχωρίζεται.

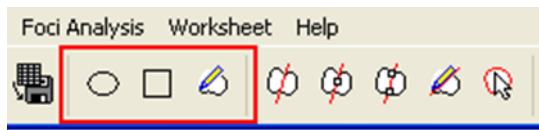
### **Background Correction**

Αφαιρεί σε κάθε ένα από τα επιλεγμένα αντικείμενα το σήμα που έχει οριστεί ως σήμα υποβάθρου, προσφέροντας μεγαλύτερη ακρίβεια στη μετρούμενη ένταση των αντικειμένων.



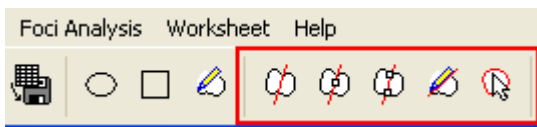
Πατώντας αυτό το πλήκτρο, το λογισμικό επιλέγει τους πυρήνες των κυττάρων σύμφωνα με τις παραμέτρους που έχουν τεθεί.

Υπάρχει δυνατότητα για περαιτέρω βελτίωση σχετικά με τα επιλεγμένα αντικείμενα, πατώντας δεξί κλικ πάνω στην εικόνα.



Εργαλεία που ζωγραφίζουν αντικείμενα. Το πρώτο ορίζει οβάλ αντικείμενα, το δεύτερο παραλληλόγραμμα, ενώ το τρίτο επιτρέπει

την ελεύθερη σχεδίαση.



Εργαλεία που διαχωρίζουν αντικείμενα. Το πρώτο κάνει αυτόματο διαχωρισμό αντικειμένων, πάνω σε όποιο σημείο της

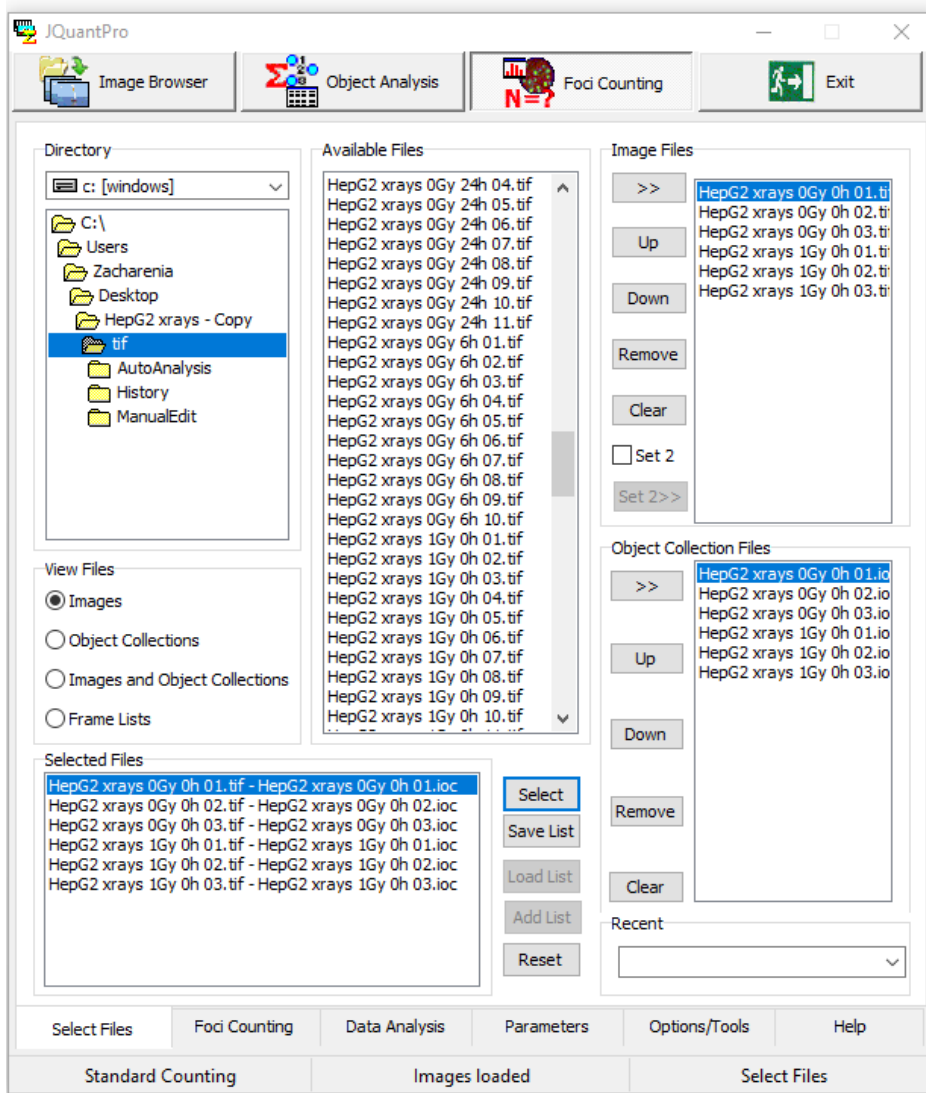
εικόνας και εάν πατηθεί. Το δεύτερο εξαναγκάζει τη διαδρομή που θα ακολουθήσει η γραμμή διαχωρισμού να περάσει από το σημείο πάνω στο οποίο βρίσκεται ο κέρσορας τη στιγμή που το πατάμε. Το τρίτο δίνει τη δυνατότητα να καθορίσει δύο σημεία από τα οποία θα περάσει η γραμμή διαχωρισμού των αντικειμένων. Το τέταρτο δίνει τη δυνατότητα ο χρήστης να επιλέξει τη γραμμή διαχωρισμού. Το τελευταίο πλήκτρο είναι το "delete".

Όταν ολοκληρώσουμε με την επιλογή των αντικειμένων μίας εικόνας πατάμε το διπλό βέλος για να πάμε στην επόμενη.

Όταν επιλέξουμε τους πυρήνες από όλα τα κότταρα κλείνουμε το JcountPro και ανοίγουμε το JquantPro. Η επιλογή των αντικειμένων, δημιούργησε ισάριθμα με τις επιλεγμένες εικόνες αρχεία με όνομα το όνομα της κάθε εικόνας και επέκταση .ios, στο φάκελο που αυτόματα δημιουργήθηκε με το όνομα "ManualEdit", ο οποίος δημιουργήθηκε μέσα στο φάκελο που περιέχει τις εικόνες.

#### 4.7.1.2 Εύρεση και καταμέτρηση των εστιών φθορισμού και του συνεντοπισμού-JquantPro

Το λογισμικό JquantPro ξεκινάει από την καρτέλα Foci Counting. Για να προχωρήσουμε χρειάζεται να επιλεγούν και οι εικόνες και τα αντίστοιχα αρχεία .ios τα οποία περιέχουν την πληροφορία για τους επιλεγμένους πυρήνες των κυττάρων. Στην **Εικόνα 2-6** φαίνονται τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν. Μετά την επιλογή πατάμε 'Select' και στη συνέχεια πηγαίνουμε στη διπλανή καρτέλα που είναι το 'Foci Counting'.



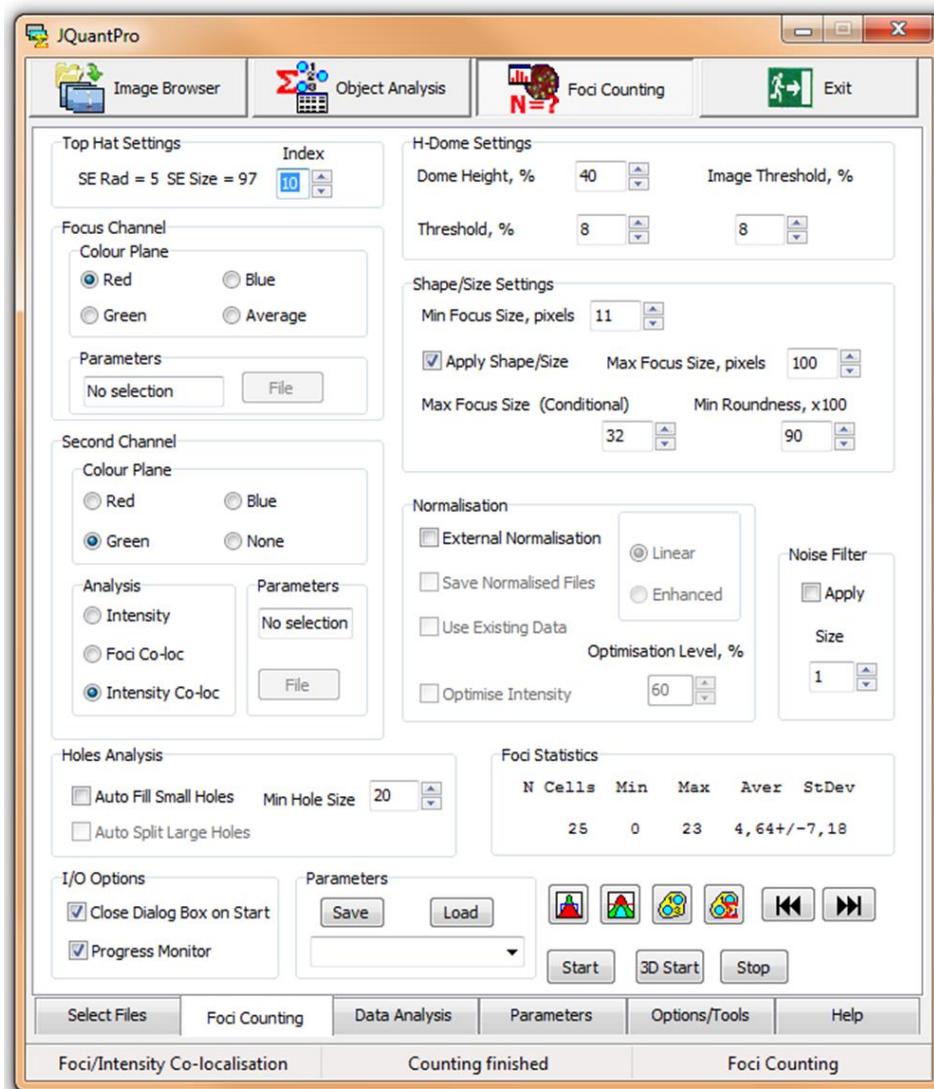
Εικόνα 4-5: Αρχικό μενού του JquantPro. Ξεκινά κατευθείαν από την καρτέλα Foci Counting. Στο επόμενο βήμα ορίζονται οι παράμετροι για την εύρεση των εστιών φθορισμού των δίκλωνων θραύσεων. Στο παράδειγμα που ακολουθεί, οι εστιές των ΔΚΘ είναι στο κανάλι του κόκκινου χρώματος.

### Top Hat Settings



Ο μετασχηματισμός Top Hat ορίζεται μέσω του μεγέθους “structural element”, το οποίο ορίζεται μέσω της ακτίνας (SE Rad) και της επιφάνειας (SE Size). Χρησιμοποιείται για να διακρίνει τις εστιές που βρίσκονται κοντά. Για τη σωστή επιλογή των εστιών το SE Size πρέπει να ορίζεται ως το μέγιστο αναμενόμενο μέγεθος των εστιών. Η επιλογή ενισχύει το σήμα των εστιών που είναι μικρότερες από το SE, ενώ το σήμα που εικάζεται ότι προέρχεται από τη διάχυση, δηλαδή στα όρια της εστίας, υποβιβάζεται.

### H-Dome Settings



Εικόνα 4-6: Επιλογή παραμέτρων για την εκτίμηση της παραμέτρου  $R_{clc}$ , θεωρούμενη πάνω στις εστίες των δίκλωνων θραύσεων, όταν εκείνες είναι στο κόκκινο κανάλι.



Ο μετασχηματισμός αυτός δημιουργεί έναν κατακερματισμό της εικόνας γύρω από τις εστίες φθορισμού. Βασίζεται στα επίπεδα της έντασης ενός δεδομένου καναλιού, το οποίο έχουμε ήδη επιλέξει, εν προκειμένω το κόκκινο, και από το ιστόγραμμα συχνότητας, εξετάζοντας κάθε κορυφή και υπολογίζοντας ένα ποσοστό του μήκους της, ξεκινώντας από το μέγιστο, με τη χρήση της παραμέτρου H-Dome height. Το αποτέλεσμα για την ένταση της κάθε κορυφής εξάγονται από το υπόλοιπο γράφημα, παράγοντας μια αλληλουχία δομών που το σχήμα τους μοιάζει με τρούλους (domes). Τα pixel που η έντασή τους είναι μέσα σε αυτήν την περιοχή ενισχύονται. Με άλλα λόγια η παράμετρος αυτή, όπως και η προηγούμενη, είναι μία μέθοδος ευρέσεως των τοπικών μεγίστων μιας εικόνας. Το ύψος που επιλέγει ο χρήστης, όπως φαίνεται και στο εικονίδιο είναι το ύψος των εντάσεων που θα αφαιρεθούν από κάθε pixel της εικόνας, ώστε στην εικόνα να

απομείνουν μόνο οι τρούλοι, εάν φανταστούμε την εικόνα ως επίπεδο και στην τρίτη διάσταση θεωρήσουμε την τιμή της έντασης του κάθε pixel. Επομένως όσο αυξάνεται το ύψος, τόσο αυξάνεται και η τιμή της έντασης που θα αφαιρεθεί από κάθε pixel, ώστε να απομείνουν μόνο οι τρούλοι. Άρα η αύξηση της τιμής του ύψους κάνει το κριτήριο αυστηρότερο.

### **Shape/Size settings**

Min focus size: δε λαμβάνει υπόψη εστίες φθορισμού που έχουν επιφάνεια μικρότερη από τον αριθμό των pixel που ορίζονται με αυτό το κριτήριο.

Max focus size: διαχωρίζει τις εστίες που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό.

Max focus size (conditional) σε συνδυασμό με το Min Roundness, διαχωρίζει τις εστίες που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από το conditional και Roundness μικρότερη από την ελάχιστη.

### **Ορισμός του δεύτερου καναλιού**

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα στο δεύτερο κανάλι είναι το πράσινο.

### **Analysis**

Για να υπολογίσει το συνεντοπισμό μέσω της παραμέτρου PclC που ορίστηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, επιλέγουμε την τρίτη επιλογή που είναι το Intensity co-loc.

Όταν ορίσουμε όλες τις παραμέτρους πατάμε το Start και επεξεργάζεται όλες τις εικόνες που έχουμε εισαγάγει.

Δημιουργείται τότε ένα «βιβλίο» που μοιάζει με αυτά που δημιουργεί το Excel.

Το οποίο περιέχει τα ακόλουθα φύλλα: Experiment, Analysis Summary, Cell Summary, Focus Summary, Distributions, Colocalization Distributions, Image Summary και 3D cluster.

Στο σημείο αυτό έχουν συμπληρωθεί από την προηγούμενη ανάλυση τα 4 πρώτα φύλλα.

Για να συνεχίσει τη στατιστική ανάλυση πρέπει να του ορίσουμε τις ομάδες των εικόνων, δηλαδή ποιες εικόνες ανήκουν στην κάθε πειραματική συνθήκη.

Στην επόμενη καρτέλα, στο **Data analysis**, έχει δύο επιλογές.: Group Settings και Analysis.

Data Analysis> Group Settings: Ορίζουμε τον αριθμό των ομάδων στο πλαίσιο Number of Groups. Στο πλαίσιο Image/Object/Files/IDs στη στήλη GroupID, δίπλα στην πρώτη εικόνα της κάθε ομάδας βάζουμε έναν αριθμό, ξεκινώντας από το '0' και πατάμε το Accept Groups.

Data Analysis>Analysis:

Data Analysis> Analysis> Standard Counting

Επιλέγουμε Analysis και δημιουργεί στο Foci Frequency Distribution Analysis, ένα ιστόγραμμα συχνοτήτων, κανονικοποιημένο στη μονάδα για τις εστίες φθορισμού των δίκλωνων θραύσεων. Περαιτέρω δίνεται η δυνατότητα για ανάλυση παλινδρόμησης με επιλογή συναρτήσεων μεταξύ Poisson (όπου δίνεται η δυνατότητα και για δίκορφη συνάρτηση Bimodal Poisson, όπως περιγράφεται και στη δημοσίευση της ομάδας του P. Lobachevsky, Martin et al [124]) και Poisson-Gamma. Στο σημείο αυτό το «βιβλίο» των αποτελεσμάτων συμπληρώνεται με το φύλλο Distributions, που περιέχει τις κατανομές για τις εστίες φθορισμού των ΔΚΘ για κάθε ομάδα.

Data Analysis> Analysis> Focus/Intensity Colocalization:

Με την επιλογή αυτή το λογισμικό JquantPro υπολογίζει την παράμετρο  $P_{cl}$ .

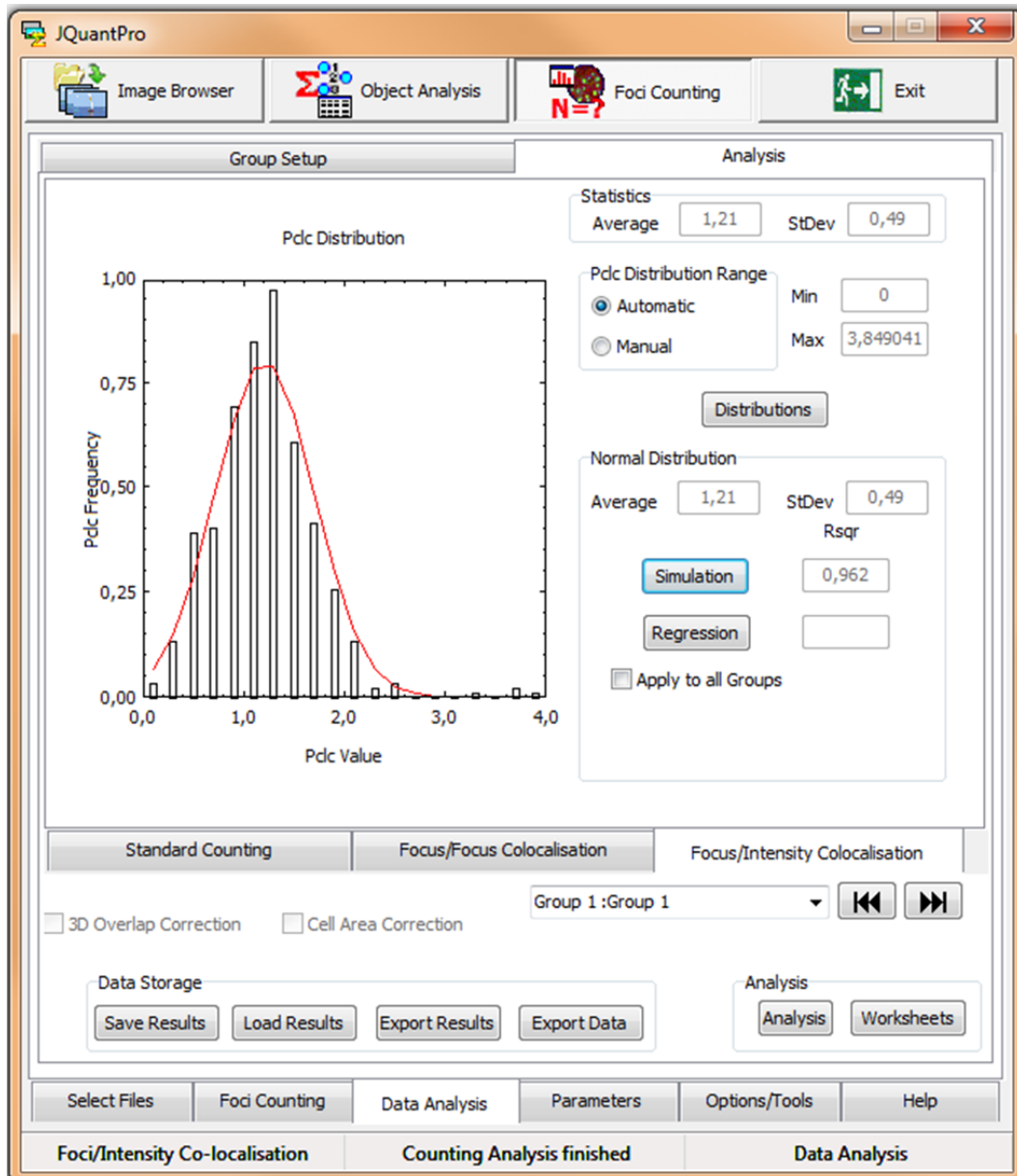
Στην **Εικόνα 4-7** φαίνεται το αποτέλεσμα ενός μικρού δείγματος 3 εικόνων από την πειραματική συνθήκη 1 Gy 0h, για HepG2 κύτταρα ακτινοβολημένα με ακτίνες -Χ. Ο δείκτης των δίκλωνων θραύσεων είναι η γ-H2AX και για τα αβασικά σημεία η πρωτεΐνη APE1.

Τα αποτελέσματα εξάγονται στο αντίστοιχο φύλλο Colocalization Distributions, στο «βιβλίο» των αποτελεσμάτων.

Επιπλέον δημιουργείται και το φύλλο Group CSummary, όπου συνοψίζει, ομαδοποιημένα ανά πειραματική συνθήκη, τα αποτελέσματα για κάθε κύτταρο.

Στο σημείο αυτό τα αποτελέσματα μπορούν να αποθηκευτούν σε ένα αρχείο .jcr που δημιουργεί το λογισμικό, ώστε να μπορεί να τα «ξαναφορτώσει», είτε να αντιγραφούν για σε κάποιο πρόγραμμα όπως το Excel για περαιτέρω επεξεργασία.





Εικόνα 4-7: Εύρεση της παραμέτρου Pdc με το λογισμικό JquantPro. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα έχει αναλύσει τρεις εικόνες από την πειραματική συνθήκη 1 Gy 0h, για HepG2 κύτταρα ακτινοβολημένα με ακτίνες -X. Ο δείκτης των δίκλωνων θραύσεων είναι η  $\gamma$ -H2AX και για τα αβασικά σημεία η πρωτεΐνη APE1.

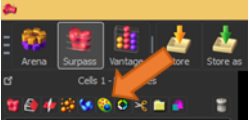
#### 4.7.2 Ανάλυση εικόνων που προέρχονται από συνεστιακό μικροσκόπιο.

Τα πειράματα που εκτελέστηκαν στο Ινστιτούτο Ιατρικής Ακτινοβιολογίας, στο Έσσην, φωτογραφήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο και οι εικόνες αναλύθηκαν με το λογισμικό Imaris της Bitplane. Σε αυτήν την παράγραφο περιγράφεται ο τρόπος που τίθενται οι παράμετροι ώστε να καταμετρηθούν οι εστίες φθορισμού καθώς και τα γεγονότα συνεντοπισμού. Ως γεγονότα συνεντοπισμού οντολογικά εννοούμε ένα τρίτο είδος εστιών,

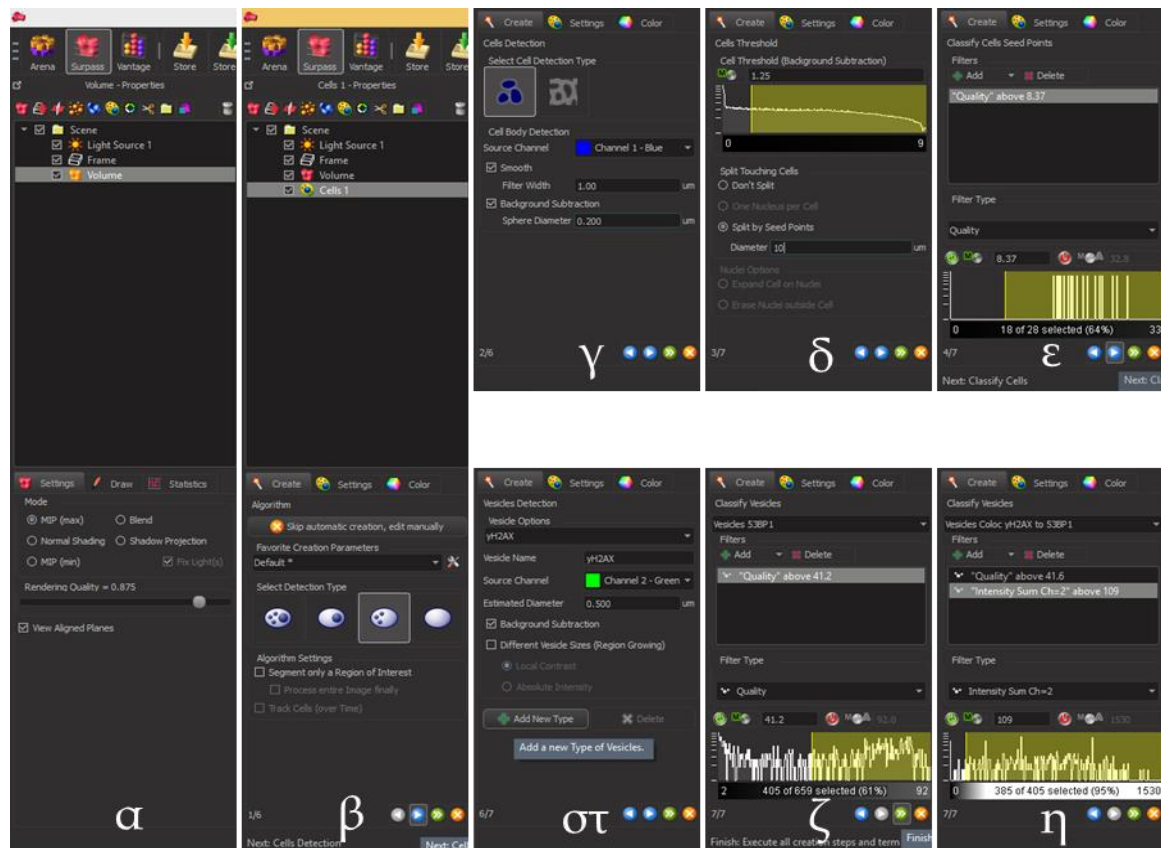
που οι παράμετροί τους είναι τέτοιες ώστε να εκφράζουν το συνεντοπισμό εκφρασμένο ως προς το ένα ή το άλλο είδος εστιών. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα πρόκειται για ένα πείραμα με κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες -X όπου οι δίκλωνες θραύσεις έχουν επισημανθεί μέσω των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης  $\gamma$ -H2AX και 53BP1. Ως γεγονότα συνεντοπισμού ( $\gamma$ -H2AX to 53BP1) εννοούμε τις εστίες οι οποίες έχουν τα χαρακτηριστικά των εστιών 53BP1, πρωτίστως και επιπλέον έχουν σήμα στο κανάλι των εστιών  $\gamma$ -H2AX (εδώ το channel-2, πράσινο). Πρόκειται δηλαδή για εστίες 53BP1 που βρίσκονται πάνω σε εστίες  $\gamma$ -H2AX. Όσον αφορά την παράμετρο Pcl<sub>c</sub>, υπολογίστηκε από τα δεδομένα που εξήχθησαν από την ανάλυση του λογισμικού, σε δεύτερο χρόνο, καθώς πρόκειται για μία νέα παράμετρο που εμείς εισαγάγαμε και το συγκεκριμένο λογισμικό είναι εμπορικό, επομένως δεν την περιέχει.

Ξεκινώντας το «χτίσιμο» του αλγορίθμου, πρέπει κανείς να ορίσει τους πυρήνες των κυττάρων. Στην **Εικόνα 4-8**, τα βήματα β έως ε περιγράφουν αυτή τη διαδικασία.

α) Από το αρχικό μενού επιλέγουμε το δεύτερο εικονίδιο 'Surpass' και από το 'Settings' επιλέγουμε το 'MIP (max)'. Η επιλογή αυτή εξασφαλίζει ότι όταν θα δείχνει ένα επίπεδο αντιπροσωπευτικό για κάθε σετ εικόνων που αποτελούν το ίδιο οπτικό πεδίο, αυτό θα είναι η προβολή των μεγίστων της έντασης για κάθε στήλη από pixel. Πρόκειται για την κοινή εντολή Maximum Intensity Projection.

β)  Επιλέγοντας το εικονίδιο με το κύτταρο ξεκινά η ρύθμιση των παραμέτρων που ορίζουν τα κύτταρα. Στο 'Select Detection Type' επιλέγουμε την τρίτη επιλογή. Κατά σειρά αυτές συμβολίζουν i) ανίχνευση κυττάρων που περιέχουν πυρήνα και εστίες φθορισμού. ii) Ανίχνευση κυττάρου που περιέχει πυρήνα. iii) ανίχνευση κυττάρου που περιέχει εστίες φθορισμού και iv) ανίχνευση κυττάρων. Επιλέγοντας το iii) οντολογικά είμαστε εντάξει, καθώς θα θεωρούμε ως «κύτταρο» τον πυρήνα του κάθε κυττάρου.

γ) Η συγκεκριμένη επιλογή έχει την έννοια ο αλγόριθμος που θα ορίσει τα κύτταρα να ξεκινά από το κέντρο του κυττάρου και να εκτείνεται σύμφωνα με τις παραμέτρους που ορίζονται στη συνέχεια. Η άλλη επιλογή είναι χρήσιμη όταν τα κύτταρα είναι πολύ κοντά το ένα στο άλλο επομένως ο διαχωρισμός των κυττάρων λαμβάνει υπόψη περισσότερο τα όρια των κυττάρων. Καθώς στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε DAPI για τη χρώση των πυρήνων των κυττάρων και αυτό φθορίζει στο μπλε χρώμα του οπτικού φάσματος, έχουμε επιλέξει ως ψευδοχρώμα και πάλι το μπλε, ως ειθισται ώστε να ταιριάζουν οι φωτογραφίες με την εικόνα που βλέπουμε από το μικροσκόπιο, επιλέγουμε για τους πυρήνες το κανάλι 1 που αντιστοιχεί στο χρώμα αυτό



Εικόνα 4-8: Αλληλουχία βημάτων ώστε να δημιουργηθεί ο κατάλληλος αλγόριθμος εντοπισμού των εστιών (εδώ  $\gamma$ -H2AX και 53BP1) καθώς και των συμβάντων συνεντοπισμού, με το λογισμικό Imaris της Bitplane.

δ) Το 'Background Substraction' αποκόπτει από όλα τα pixel της εικόνας κάποια τιμή της έντασης που ορίζεται από το χρήστη ως υπόβαθρο. Στη συνέχεια επιλέγουμε το διαχωρισμό των κυττάρων που βρίσκονται κοντά μέσω των Seed Points. Στην Ανάλυση Εικόνας seed point μιας τοπολογικής οντότητας είναι το κέντρο γύρω από το οποίο εκτείνεται το κάθε αντικείμενο. Δηλαδή ο αλγόριθμος που το χτίζει είναι τέτοιος ώστε να ξεκινά τη θεώρηση του αντικειμένου από κάποιο κέντρο και συνεχίζει να προσθέτει pixel που θεωρεί ότι ανήκουν στο ίδιο αντικείμενο σύμφωνα με τα όποια άλλα κριτήρια μπορεί

να περιέχει. Εδώ seed point νοείται το pixel το οποίο το λογισμικό έχει θέσει ως κέντρο του κυττάρου. Επομένως, ορίζοντας ως κριτήριο διαχωρισμού την απόσταση των κέντρων των κυττάρων με την τιμή που εδώ έχουμε θέσει 10  $\mu\text{m}$ , οδηγούμε το πρόγραμμα ώστε να γνωρίζει ποια είναι η αναμενόμενη διάμετρος των κυττάρων. Το Imaris περιέχει έναν πολύ αξιόπιστο αλγόριθμο ώστε να εντοπίζει τα αντικείμενα, είτε είναι κύτταρα είτε είναι εστίες φθορισμού, τον επονομαζόμενο **'quality'**. Ίσως να είναι αυτός ο αλγόριθμος που το έχει κάνει διεθνώς ένα από τα πιο αξιόπιστα αλλά και πιο κοστοβόρα λογισμικά στην αναγνώριση των εστιών φθορισμού. Στο εγχειρίδιο που διαθέτει η εταιρία ([http://www.bitplane.com/download/manuals/ReferenceManual6\\_1\\_0.pdf](http://www.bitplane.com/download/manuals/ReferenceManual6_1_0.pdf)) ορίζεται κάπως ασαφώς ως « Η 'Quality' είναι η ένταση στο κέντρο του σποτ στο κανάλι που το σποτ ανιχνεύεται.

Εάν το 'Background Substraction' δεν είναι επιλεγμένο, αυτή είναι η ένταση στο κανάλι φιλτραρισμένη με κανονική κατανομή από τα  $\frac{3}{4}$  της ακτίνας του σποτ. Εάν είναι επιλεγμένο το 'Background Substraction' η ένταση είναι η προηγούμενη (που είναι φιλτραρισμένη με κανονική κατανομή) μείον την αρχική φιλτραρισμένη από τα  $\frac{8}{9}$  της ακτίνας του σποτ.» Η παράμετρος αυτή μοιάζει να είναι συνδυασμός των παραμέτρων 'Top Hat' και 'H-Dome' που χρησιμοποιεί το λογισμικό JcountPro.

Επιλέγουμε λοιπόν για την εύρεση των πυρήνων από τα διαθέσιμα φίλτρα, την παράμετρο 'Quality', στην οποία θέτουμε κάποιο κάτω φράγμα. Το κριτήριο αυτό αποφασίζεται από την εικόνα που δείχνει ταυτόχρονα το λογισμικό, η οποία όπως επιλέξαμε στο **βήμα α)** είναι η εικόνα των μέγιστων προβολών, καθώς το λογισμικό καταδεικνύει ποια κύτταρα επιλέγονται και ποια εξαιρούνται καθώς κινούμε από τον κέρσορα από αριστερά του ιστογράμματος προς τα δεξιά.

#### **Ορισμός των εστιών φθορισμού.**

στ) Στο στάδιο αυτό ορίζονται τα είδη των εστιών που θα ανιχνευτούν. Δίνεται το όνομα, το βασικό κανάλι στο οποίο ορίζονται και προαιρετικά δίνεται η εκτιμώμενη διάμετρος τους. Στο συγκεκριμένο πλαίσιο φαίνεται που έχουμε ορίσει της εστίες του  $\gamma\text{-H2AX}$  να τις ψάχνει στο πράσινο χρώμα και να έχουν διάμετρο 0,5  $\mu\text{m}$ . Ομοίως ορίσαμε και για τις υπόλοιπες εστίες, για τη 53BP1 να την ψάχνει στο κόκκινο κανάλι καθώς και τις εστίες γεγονόςτα συνεντοπισμού τις 'γH2AX to 53BP1'. Αντίστοιχα ορίσαμε και τις εστίες '53BP1 to γH2AX' να τις ψάχνει στο πράσινο χρώμα. Αφού δώσουμε όνομα σε κάθε είδος εστίας (vesicle) προς ανίχνευση πατάμε το δεξί βέλος και πάμε στο επόμενο βήμα. ζ) Εδώ ορίζονται τα φίλτρα σύμφωνα με τα οποία θα γίνεται η ανίχνευση των εστιών. Τα φίλτρα έχουν ισχύ κατά προτεραιότητα σύμφωνα με τη σειρά που ορίζονται.

η) Ένα παράδειγμα όπου έχουμε επιλέξει περισσότερα του ενός φίλτρα. Πρόκειται για τα γεγονότα συνεντοπισμού 'yH2AX to 53BP1'. Ως πρώτο κριτήριο θέσαμε ακριβώς το κριτήριο που φαίνεται στο ζ για τις εστίες 53BP1. Ως επιπλέον κριτήριο θέσαμε ένα κριτήριο που αφορά την ένταση στο κανάλι των εστιών yH2AX, που είναι το channel 2, δηλαδή το πράσινο χρώμα. Θέλουμε η ένταση στο πράσινο να είναι πάνω από μία ελάχιστη τιμή.

Συγκρίνοντας τα δύο λογισμικά:

Το JquantPro, έχει πλέον ενσωματωμένη την παράμετρο PclC, επομένως η ανάλυση για την εύρεση αυτής της παραμέτρου γίνεται πολύ πιο γρήγορα, καθώς για τα δεδομένα από το Imaris χρειάζεται ιδιαίτερα πολύς χρόνος για το κάθε πειραματικό σημείο.

Το Imaris αναλύει και τρισδιάστατες εικόνες αλλά και το JquantPro, που διαρκώς αναπτύσσεται στο μέλλον θα αναλύει και εκείνο.

Τα Jcount-Jquant αφήνουν το χρήστη να επέμβει επακριβώς σε όλες τις διαθέσιμες παραμέτρους, επομένως για τον έμπειρο χρήστη είναι πιο χρήσιμο, αλλά από την άλλη μεριά το Imaris καθώς είναι αυτοματοποιημένο δίνει καλά αποτελέσματα και σε λιγότερο έμπειρους χρήστες.

Το Imaris διαθέτει την παράμετρο quality η οποία είναι μεν πολύ αξιόπιστη, αλλά καθώς είναι μίξη παραμέτρων, που δεν επιτρέπεται στο χρήστη να επέμβει, δεν είναι σίγουρος αν παράγει συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των πειραμάτων.

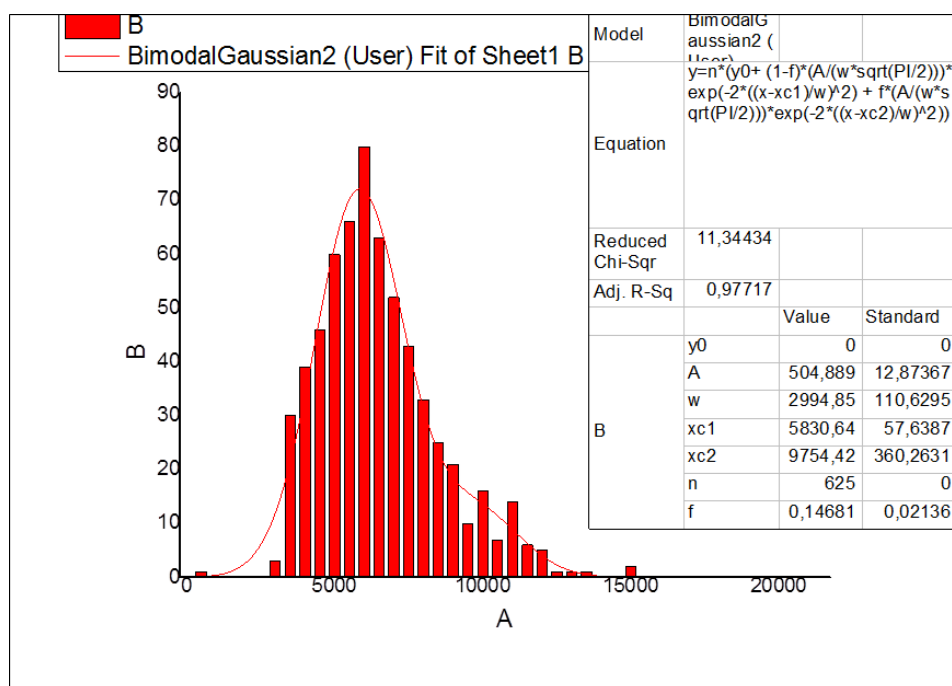
Το Imaris δίνει επιπλέον τη δυνατότητα στο χρήστη να ορίσει την ιεραρχία των παραμέτρων που θα χρησιμοποιήσει, ενώ στα λογισμικά Jcount-Jquant είναι προκαθορισμένη, χωρίς επιπλέον να γίνεται σαφές στο χρήστη ποια παράμετρος βαραίνει περισσότερο.

## 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 Μετρήσεις διαστάσεων

#### 5.1.1 Υπολογισμός επιφάνειας κυττάρων στις G0-G1 φάσεις

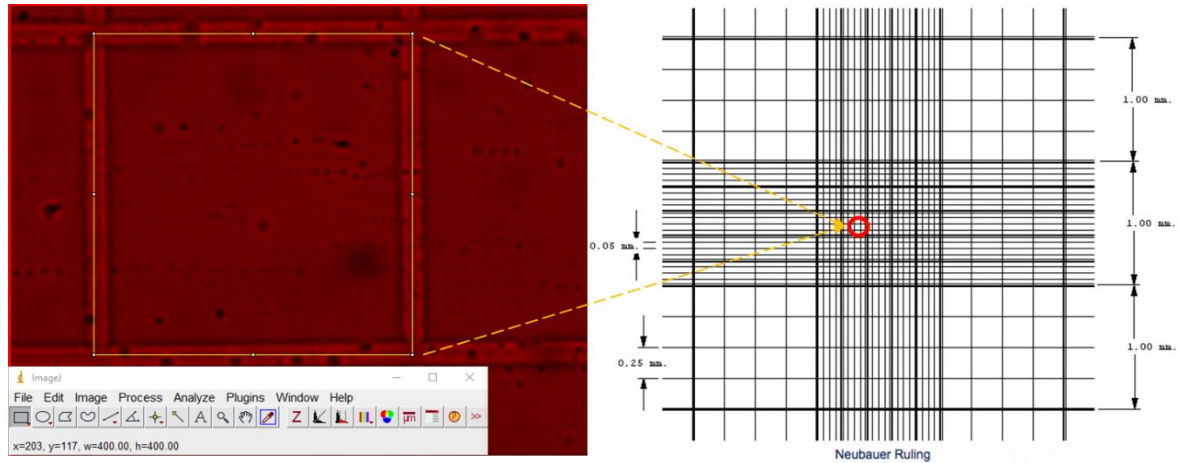
Για τον υπολογισμό της επιφάνειας των πυρήνων των HepG2 κυττάρων ελήφθησαν υπόψιν όλα τα διαθέσιμα κύτταρα από το πειραματικό σημείο των '0 h', δηλαδή 625 κύτταρα, από όλες τις δόσεις. Ταξινομήθηκαν σε ιστόγραμμα συχνότητας και στη συνέχεια εφαρμόστηκε μία Γκαουσιανή κατανομή 2<sup>ου</sup> βαθμού για να βρεθούν οι δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί την επιφάνεια του πυρήνα (σε pixel) των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G0-G1 του κυτταρικού κύκλου, ενώ η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στα κύτταρα που έχουν περάσει τη Σύνθεση και βρίσκονται στη φάση G2. Η προσέγγιση παρουσιάζεται στο **Γράφημα 5-1**.



Γράφημα 5-1: Προσαρμογή καμπύλης στο ιστόγραμμα συχνοτήτων για την εύρεση της επιφάνειας των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G0 ή G1. Οι προσδιορισθείσες τιμές xc1 και xc2 μετρούνται σε pixel.

Στον **Πίνακα 5-1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσέγγισης. Η προσαρμογή της καμπύλης έδωσε τα αποτελέσματα σε pixel, για τη μετατροπή τους σε  $\mu\text{m}^2$ , έγινε πολλαπλασιασμός με  $\frac{25 \mu\text{m}^2}{1600 \text{ pixel}}$ . Η βαθμονόμηση του συστήματος απεικόνισης που είναι

συνδεδεμένο με το μικροσκόπιο που βρίσκεται στο εργαστήριο Υγειοφυσικής στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», έγινε φωτογραφίζοντας ένα πλακάκι Neubauer (κυτταρόμετρο), το οποίο έχει χαραγμένα τετράγωνα γνωστών διαστάσεων, τα pixels μετρήθηκαν με το λογισμικό ImageJ (Εικόνα 5-1).



Εικόνα 5-1 Βαθμονόμηση του μικροσκοπίου επιφθορισμού. Φωτογραφήθηκε ένα πλακάκι Neubauer (αριστερά) και έγινε η αντιστοίχιση των pixels που μετρήθηκαν με τη βοήθεια του ImageJ, (400 x 400) για το τετράγωνο που αντιστοιχεί στη μικρότερη υποδιαίρεση του πλακιδίου (0,05mm x 0,05mm) (δεξιά).

Πίνακας 5-1: Αποτελέσματα της προσέγγισης σε pixels και σε  $\mu\text{m}^2$

		Επιφάνεια [pixels]	±	Επιφάνεια [ $\mu\text{m}^2$ ]	±	διάμετρος [ $\mu\text{m}$ ]	
G0-G1	peak1	5831	58	91,1	0,9	10,77	$\delta_1$
G2	peak2	9754	360	152,4	2,4	13,93	$\delta_2$
(η μέση επιφάνεια των πυρήνων εάν δε ληφθεί υπόψη η φάση του κυτταρικού κύκλου είναι $97.7 \pm 32.1 \mu\text{m}^2$ )							

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της προσέγγισης για τις κορυφές peak1 και peak2, έγινε η υπόθεση ότι εφόσον τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G2 έχουν το διπλάσιο περιεχόμενο σε DNA, τότε θα έχουν και το διπλάσιο όγκο

$$V_2 = 2V_1.$$

- Εάν θεωρηθεί ότι οι πυρήνες έχουν σχήμα σφαιρας, τότε για το λόγο των διαμέτρων τους,  $\delta_1$  και  $\delta_2$ , θα ισχύει

$$\frac{\delta_2}{\delta_1} = \sqrt[3]{2} \quad (\text{διότι } \frac{4}{3}\pi(\frac{\delta_2}{2})^3 = 2 \frac{4}{3}\pi(\frac{\delta_1}{2})^3).$$

- Εάν θεωρηθούν τα κύτταρα ως κύλινδροι που έχουν το ίδιο ύψος ( $v$ ), τότε για το λόγο των διαμέτρων τους,  $\delta_1$  και  $\delta_2$ , θα ισχύει

$$\frac{\delta_2}{\delta_1} = \sqrt{2} \quad (\text{διότι } \pi(\frac{\delta_2}{2})^2 v = 2 \pi(\frac{\delta_1}{2})^2 v).$$

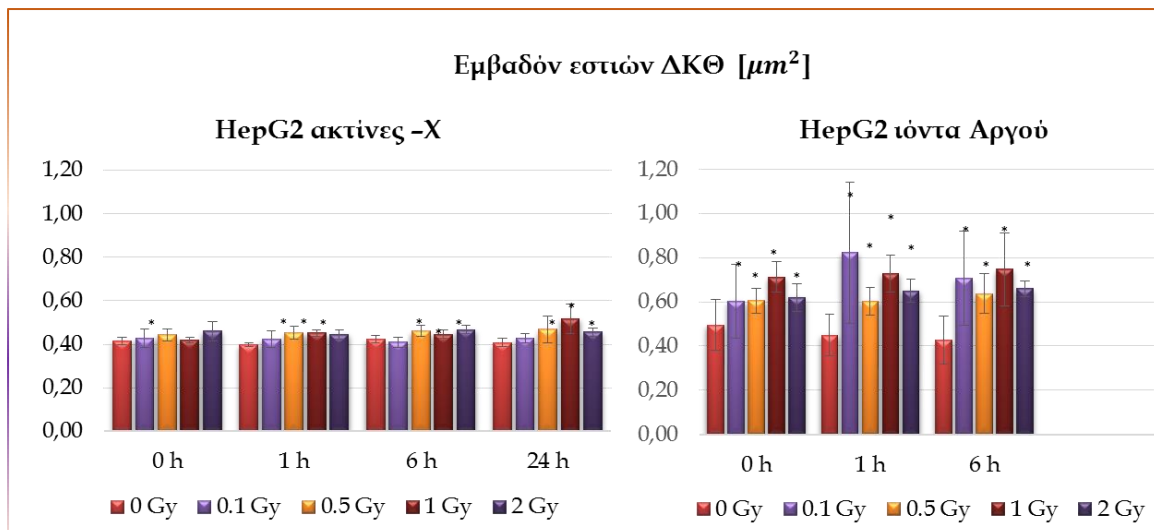
Ο λόγος των διαμέτρων που προκύπτει από την ανάλυση που περιγράφεται στον **Πίνακα 5-1** είναι  $\frac{\delta_2}{\delta_1} = 1,29$ , και βρίσκεται επομένως μεταξύ των δύο ως άνω υπολογισμένων τιμών:

$$1,26 = \sqrt[3]{2} < \frac{\delta_2}{\delta_1} = 1,29 < \sqrt{2} = 1,41$$

Βάσει της προηγηθείσας ανάλυσης ο τρόπος προσέγγισης μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστος.

### 5.1.2 Μετρήσεις επιφάνειας για εστίες φθορισμού που σχηματίζονται μετά από έκθεση σε ακτίνες-Χ ή σε ιόντα Αργού

Στο **Γράφημα 5-2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις επιφάνειας για τις εστίες φθορισμού των ΔΚΘ σε κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα σε ακτίνες -Χ ή σε ιόντα Αργού. Οι μετρήσεις έγιναν εφικτές μέσω του λογισμικού Jcount που δίνει αποτελέσματα σε pixel και της βαθμονόμησης που περιγράφεται στην **Εικόνα 5-1**.



Γράφημα 5-2: Μέτρηση της επιφάνειας των εστιών φθορισμού για τις ΔιΚλωνες Θραύσεις, για κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα σε ακτίνες -Χ ή σε ιόντα Αργού.

Από τη μελέτη του γραφήματος προκύπτει ότι είναι μεν μεγαλύτερες οι εστίες που δημιουργούν τα ιόντα Αργού για τα αντίστοιχα πειραματικά σημεία (δόση & χρόνος) που δημιουργούν οι ακτίνες -Χ, αλλά όχι με ευθέως ανάλογο τρόπο. Αν συνεκτιμηθούν και τα αποτελέσματα του **Γραφήματος 5-12**, αυτή η παρατήρηση συνηγορεί στην πεποίθηση ότι αυξανόμενη της LET οι βλάβες γίνονται πυκνότερες. Έτσι πλέον χάνεται η '1-1' αντιστοιχία των εστιών φθορισμού με τις ΔΚΘ, η οποία ισχύει για τις ακτίνες -Χ.



### 5.1.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίου, εάν γίνει σωστή βαθμονόμηση του συστήματος απεικόνισης, μπορεί να δώσει με καλή ακρίβεια αποτελέσματα για το φυσικό μέγεθος των υπό εξέταση αντικειμένων. Τα αποτελέσματα της βαθμονόμησης της παραγράφου 5.1.1 αξιοποιήθηκαν για το θεωρητικό υπολογισμό των κρούσεων ιόντων Αργού ανά κύτταρο για τις διάφορες δόσεις στις οποίες εκτέθηκαν HepG2 κύτταρα (**Πίνακας 4-1**). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων διαστάσεων των εστιών φθορισμού (**Γράφημα 5-2**) σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα για τον αριθμό των εστιών των ΔΚΘ που επάγονται σε HepG2 κύτταρα μετά από έκθεση σε ακτίνες -Χ ή ιόντα Αργού (**Γράφημα 5-3**), φανερώνει την αύξηση της πολυπλοκότητας της επαγόμενης βλάβης, με την αύξηση της LET (ιόντα Αργού) της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

## 5.2 Μελέτη δίκλωνων θραύσεων

### 5.2.1 Ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων σε πολύ χαμηλές δόσεις

(Παρουσιάζεται εδώ ένα πείραμα που εκτελέστηκε στην οδοντιατρική σχολή και εμείς συνεισφέραμε στην καταμέτρηση των εστιών φθορισμού, σε συνεργασία με τις Δρα Τερζούδη και Δρα Χατζή.)

#### 5.2.1.1 Περιγραφή του πειράματος

Στις 17/6/16 κύτταρα HEK293 ακτινοβολήθηκαν (Irr) με τον οδοντιατρικό τομογράφο. Επώαστηκαν για 0,5, 6 και 48 ώρες (Σχήμα 5-1). Για τα αντίστοιχα χρονικά σημεία είχαμε τη σειρά μάρτυρα Ctr2, τα οποία ακολούθησαν τα Irr στη διαδρομή από το ένα εργαστήριο στο άλλο, χωρίς να ακτινοβοληθούν. Επιπρόσθετα πλακίδια μάρτυρες αποτελούν τα Ctr1, τα οποία παρέμειναν στον κλίβανο επώασης για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε χρώση ανοσοφθορισμού για τη γH2AX. Δεν έγινε χρώση των πυρήνων με DAPI.



Σχήμα 5-1 Πειραματικές συνθήκες

#### 5.2.1.2 Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο έδειξε ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων γεμάτα από εστίες φθορισμού, ειδικά για τις πρώτες ώρες, ποσοστό το οποίο ήταν μικρότερο στις 48 ώρες. Η πλειονότητα των κυττάρων είχε από 0-3 εστίες φθορισμού. Ελήφθησαν εικόνες, μόνο με το πράσινο φίλτρο (FITC), καθώς κατά την ημέρα λήψης το μικροσκόπιο δε διέθετε τη λάμπα αλογόνου (για DIC images, ώστε να γίνουν ορατοί οι πυρήνες). Οι εικόνες είναι κατά περίπτωση ελαφρώς προσαρμοσμένες ώστε να φαίνονται τα όρια των πυρήνων, μιας και δεν υπήρχε άλλη δυνατότητα απεικόνισης των πυρήνων.

#### 5.2.1.3 Μέθοδος καταμέτρησης

Καθώς πρόκειται για πολύ χαμηλή δόση, για να φανούν οι όποιες διαφορές μεταξύ των συνθηκών, κρίθηκε σκόπιμο να αναλυθούν οι εικόνες με το μάτι, ως πιο γρήγορη μέθοδος, από το να ληφθούν εικόνες και να επεξεργαστούν με κάποιο από τα διαθέσιμα λογισμικά καταμέτρησης εστιών. Εξάλλου δεν υπήρχε και η δυνατότητα αφού για να απεικονιστεί ο

πυρήνας (μέσω της μη επιλεκτικής πρόσδεσης του αντισώματος), οι εικόνες ήταν τέτοιες ώστε να κάνουν ορατή τη μη επιλεκτική πρόσδεση κατά περίπτωση. Επομένως για κάθε πλακάκι μετρήθηκαν 10 οπτικά πεδία μικροσκοπίου (30-60 κύτταρα έκαστο), ενώ το οπτικό πεδίο της φωτογραφίας περιέχει περίπου 10 κύτταρα. Για κάθε οπτικό πεδίο μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που ήταν γεμάτα με εστίες, τα οποία σημειώθηκαν ως «μη αριθμήσιμα», ενώ για τα υπόλοιπα καταγράφηκε αναλυτικά ο αριθμός εστιών που περιείχαν. Στη στατιστική ανάλυση που ακολουθεί, οι «εστίες / κύτταρο» αναφέρονται στα «αριθμήσιμα» κύτταρα και όχι στο σύνολο. Τα μη αριθμήσιμα τα αναφέρουμε και τα μετράμε γιατί ακολουθήσαμε τη συλλογιστική που λέει ότι τα κύτταρα με τα πάμπολλες εστίες είναι κύτταρα που βρίσκονται στη σύνθεση.

Η υπόθεση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 5-2**, όπου παρατηρούμε ότι το ποσοστό των «μη αριθμήσιμων κυττάρων πέφτει με το χρόνο, ενώ αυξάνεται ο συνολικός αριθμός κυττάρων που περιέχονται μέσα σε 10 οπτικά πεδία. Άρα καθώς φτάνουμε στις 48 ώρες, τα πλακάκια γίνονται «κορεσμένα» από κύτταρα, και λόγω της κατάστασης αυτής ο ρυθμός της σύνθεσης μειώνεται.

Για τους χρόνους 0,5h → 6h → 48h, ανιχνεύτηκαν κύτταρα στη σύνθεση 37% → 40% → 25%.

Κύτταρα ανά οπτικό πεδίο 42 → 59 → 49.

#### 5.2.1.4 Αποτελέσματα

*Πίνακας 5-2 Αποτελέσματα ανάλυσης παλινδρόμησης που έγινε επί των διαγραμμάτων συχνότητας για κάθε συνθήκη. Δίνεται η κορυφή και το standard error (δηλαδή το σφάλμα της προσέγγισης).*

Εστίες / αριθμήσιμο κύτταρο											
<b>peak</b>	0.059	0.039	0.050	<b>peak</b>	0.081	0.040	0.081	<b>peak</b>	0.181	0.085	0.11094
<b>sterr</b>	0.004	0.002	0.004	<b>sterror</b>	0.004	0.004	0.006	<b>sterr</b>	0.011	0.011	0.0023
<b>Ctrl</b>	<b>0.5h</b>	<b>6h</b>	<b>48h</b>	<b>Ctrl2</b>	<b>0.5h</b>	<b>6h</b>	<b>48h</b>	<b>Irr</b>	<b>0.5h</b>	<b>6h</b>	<b>48h</b>

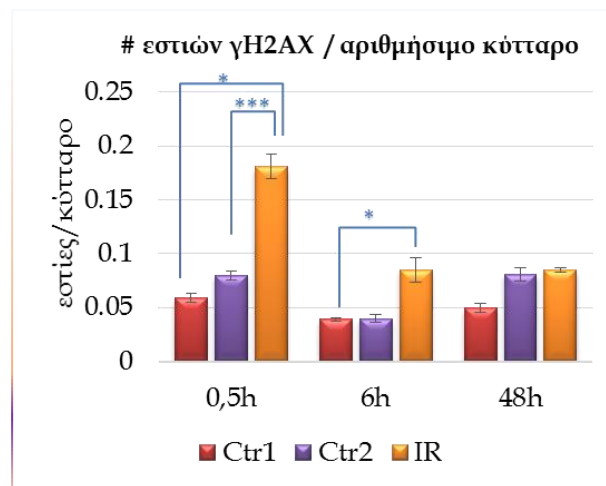
Μεταξύ των συνθηκών έγινε ο στατιστικός έλεγχος T-test (στη γενική περίπτωση two-tailed distribution, two-sample unequal variance), (**Πίνακας 5-3**).

*Πίνακας 5-3: Στατιστικός έλεγχος μεταξύ των συνθηκών κάθε χρονικού σημείου*

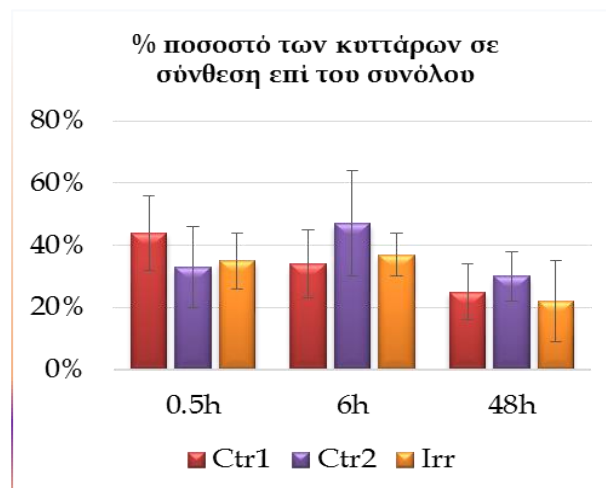
Student's T-test (two-tailed distribution, two-sample unequal variance)								
0,5h			6h			48h		
Ctrl1-Ctrl2	Ctrl1-IR	Ctrl2-IR	Ctrl1-Ctrl2	Ctrl1-IR	Ctrl2-IR	Ctrl1-Ctrl2	Ctrl1-IR	Ctrl2-IR
0.344916	0.037014	0.000192	0.246059	0.007896	0.163083	0.59484	0.966511	0.5461
-	*	***	-	**	-	-	-	-

Για την επισκόπηση των αποτελεσμάτων έγινε το **Γράφημα 5-3** όπου συνδυάζονται τα αποτελέσματα των **Πινάκων 5-2** και **5-3**. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με αστερίσκους, σύμφωνα με τον **Πίνακα 5-3**.

Για την επαλήθευση της υπόθεσης ότι τα κύτταρα που έχουν πάρα πολλές εστίες, είναι κύτταρα που βρίσκονται στη Σύνθεση, αφού τα καταμετρήσαμε ανά οπτικό πεδίο, παρουσιάζονται τα συνολικά αποτελέσματα ανά πειραματικό σημείο στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 5-4**). Τα ίδια αποτελέσματα παρουσιάζονται και σε διάγραμμα συχνοτήτων στο **Γράφημα 5-4**.



Γράφημα 5-4 Αριθμός των εστιών της  $\gamma$ -H2AX στα κύτταρα που κρίθηκαν κατάλληλα για καταμέτρηση. Ο στατιστικός έλεγχος έγινε ανά χρονικό σημείο. Στη μισή ώρα είναι ανιχνεύσιμες οι διαφορές, συγκρινόμενες και με τα δύο πλακίδια ελέγχου, ενώ στις 6 ώρες μόνο ως προς το ένα. Στις 48h οι όποιες πρόσθετες βλάβες έχουν επιδιορθωθεί.



Γράφημα 5-3: καταμέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων που παρουσίασαν μεγάλο αριθμό εστιών, για την επαλήθευση της υπόθεσης ότι πρόκειται για κύτταρα που βρίσκονται στη σύνθεση. Πράγματι τα ποσοστά συνάδουν με αυτήν την υπόθεση. Επίσης το γεγονός ότι το ποσοστό μειώνεται στις 48h συνηγορεί στην υπόθεση, καθώς πρόκειται για κορεσμό του πληθυσμού και επομένως οι ρυθμοί της σύνθεσης πέφτουν.

Πίνακας 5-4: Αριθμός κυττάρων που παρουσιάζουν πάρα πολλές εστίες φθορισμού (μη μετρήσιμα κύτταρα) σε σχέση με το συνολικό πληθυσμό κυττάρων, για την κάθε πειραματική συνθήκη.

	<b>Ctrl1</b>	<b>Ctrl2</b>	<b>Irr</b>	<b>Ctrl1</b>	<b>Ctrl2</b>	<b>Irr</b>	<b>Ctrl1</b>	<b>Ctrl2</b>	<b>Irr</b>
	<b>0.5h</b>	<b>0.5h</b>	<b>0.5h</b>	<b>6h</b>	<b>6h</b>	<b>6h</b>	<b>48h</b>	<b>48h</b>	<b>48h</b>
<b>μετρήσιμα</b>	235	280	290	305	272	299	392	348	345
<b>μη μετρήσιμα</b>	183	135	157	164	243	174	128	145	94
<b>% ποσοστό μη μετρήσιμων επί του συνόλου</b>	44%	33%	35%	34%	47%	37%	25%	30%	22%
<b>Stdev</b> (υπολογισμένο ανά οπτικό πεδίο)	12%	13%	9%	11%	17%	7%	9%	8%	13%

### 5.2.1.5 Συμπεράσματα

- 1) Το πείραμα είναι επιτυχημένο διότι εκ του αποτελέσματος των στατιστικών ελέγχων t-test συνάγεται ότι μετρήσαμε ικανό αριθμό κυττάρων ώστε να είναι ανιχνεύσιμες οι βλάβες στη 0.5h.
- 2) Ήδη από τις 6 h τα κύτταρα έχουν επιδιορθωθεί, αυτό μπορούμε να το αποφανθούμε με βεβαιότητα, δεδομένου ότι στη 0,5 h οι διαφορές ακτινοβολημένου και Ctrl2 ήταν ανιχνεύσιμες.
- 3) Η υπόθεσή μας ότι τα κύτταρα με τις πολλές εστίες φθορισμού («μη αριθμήσιμα») αντιστοιχούν σε κύτταρα στη φάση της Σύνθεσης είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα ως προς την αναλογία πληθυσμών καθώς εξελίσσεται ο χρόνος.

## 5.2.2 Επαγωγή και επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων σε λεμφοκύτταρα υγιών δοτών

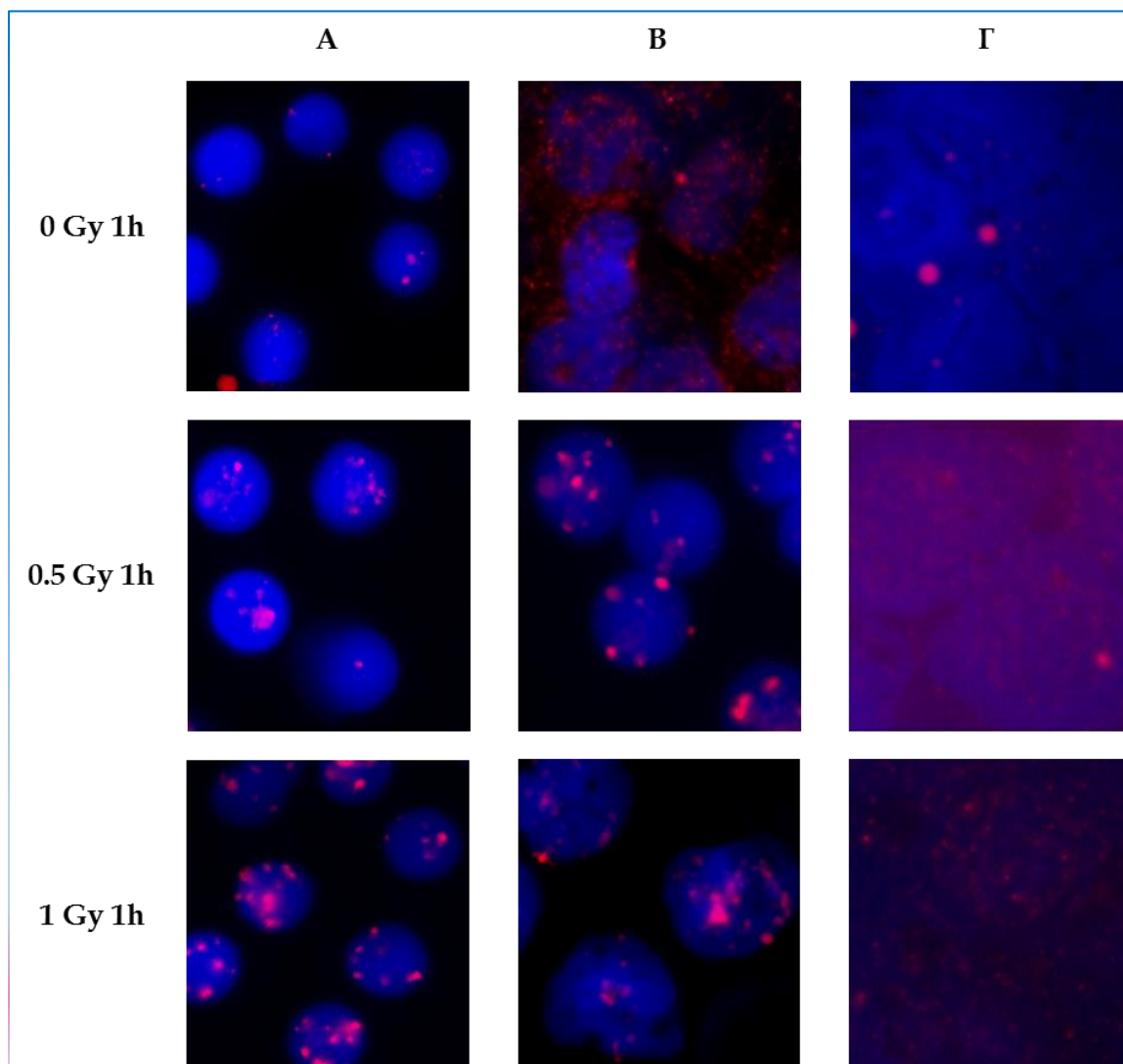
### 5.2.2.1 Προσδιορισμός πρωτοκόλλου:

Για τον προσδιορισμό του κατάλληλου πρωτοκόλλου για ανοσόχρωση  $\gamma$ -H2AX σε λεμφοκύτταρα έγιναν διάφορα προκαταρκτικά πειράματα. Στις 19/12/12 έγινε αιμοληψία από το Δότη 'Δ', απομόνωση λεμφοκυττάρων με χρήση του Biocoll Separating Solution (Φυκόλη) σε αναλογία αίματος : Φυκόλης, 1:1, φυγοκέντριση για 20' στις 1800 rpm, 35 °C, επιτάχυνση=επιβράδυνση=1. Σύλλογή των λεμφοκυττάρων, αραιώση σε δύο νέους σωλήνες, με πλήρες θρεπτικό μέσο, και νέα φυγοκέντριση ώστε να ξεπλυθούν τα κύτταρα από τη φυκόλη (1500rpm, 15 min, επιτ=επιβρ=1). Απόχυση υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 4 ml πλήρους μέσου για κάθε σωλήνα. Ακτινοβόληση με 0 και 1 Gy (ακτίνες  $\gamma$ ) και επώαση για 45 min στους 37 °C. Ακολούθησε blocking σε 1% BSA σε PBS και επώαση με τα 1 $\mu$ y αντισώματα (mouse, rabbit) αραιωμένα 1:100 σε 1% BSA. Επώαση με τα πρωτεύοντα αντισώματα κατά τη διάρκεια της νύχτας και την επόμενη, ξέπλυμα 3 x 5 min με PBS και προσθήκη δευτερευόντων αντισωμάτων σε αραιώση 1:400 σε 1% BSA για 50'. Ξέπλυμα 3 x 5 min PBS, ένα γρήγορο ξέπλυμα με αιθανόλη, στέγνωμα και χρώση των πυρήνων με Dapi. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο έδειξε πολύ μεγάλο σήμα υποβάθρου και μάλιστα είχε βαφτεί και το κυτταρόπλασμα.

Από την εκ των υστέρων εμπειρία, κρίνοντας αυτό το πρώτο πρωτόκολλο παρατηρούμε ότι οι αραιώσεις των αντισωμάτων ήταν πολύ μικρές (1:100 και 1:400), ενώ αυτές που προσδιορίστηκαν τελικά ήταν πολύ μεγαλύτερες (1:1000 και 1:4000). Ο χρόνος επώασης με το πρωτεΐν αντισωμα τελικά μειώθηκε στη μία ώρα, το στάδιο της αφυδάτωσης με αιθανόλη παρατάθηκε στα 15 min. Η συγκέντρωση του BSA στο blocking solution δεκαπλασιάστηκε, ενώ προστέθηκε και FBS και λίγο triton-X (10%, 6% και 0.02% v/v, αντίστοιχα).

Στις 11/2/13 και αφού είχαν μεσολαβήσει άλλα πειράματα σε κύτταρα MCF7, έγινε πείραμα με λεμφοκύτταρα του Δότη 'Ζ' όπου δοκιμάστηκε η επώαση των λεμφοκυττάρων σε υπότονο διάλυμα KCl (75 mM) ώστε να διογκωθούν για να γίνουν ευκολότερα μετρήσιμες οι εοτίες φθορισμού, επίσης επιπλέον δοκιμάστηκε να αφεθούν να στεγνώσουν τα κύτταρα πριν τη μονιμοποίηση, και δοκιμάστηκε η επώαση σε υπότονο που περιέχει 0,1% triton-X και να αφεθούν να στεγνώσουν. Οι συνθήκες που είχαν προσδιοριστεί από άλλα πειράματα είναι οι ακόλουθες: α) η σύσταση του blocking solution (10% BSA, 6%

FBS, 0.02% Triton X), β) η αραιώση του πρωτεύοντος αντισώματος (1:1000), γ) Τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτεΐν αντισώμα για 24h,



Εικόνα 5-2: Εικόνες από το μικροσκόπιο για τις συνθήκες Α) βύθιση σε υπότονο διάλυμα (KCl 75 mM) πριν τη μονιμοποίηση, Β) βύθιση σε υπότονο και στέγνωμα πριν τη μονιμοποίηση και Γ) βύθιση σε υπότονο που περιέχει 1% triton-X. Παρατηρήσαμε ότι το υπότονο βελτιώνει την εικόνα σε σχέση με προηγούμενο πείραμα, ότι το στέγνωμα πριν τη μονιμοποίηση χαλάει τη μορφολογία και ιδιαιτέρως το διάλυμα που περιείχε και triton-X παρουσίασε ολοκληρωτική καταστροφή της μορφολογίας και αδυναμία χρώσης. Θα μπορούσε να επανεξεταστεί το στέγνωμα σε μελλοντικά πειράματα με αυστηρά μετρημένο το χρόνο που αφήνονται να στεγνώσουν τα κύτταρα.

δ) η αραιώση του δευτερεύοντος αντισώματος (1:4000), ε) το γεγονός ότι γίνεται blocking και πριν το δευτερεύον αντισώμα και στ) η αφυδάτωση γίνεται με μία βύθιση για 10 min σε 100% αιθανόλη στους -20 °C (είχαν μεσολαβήσει πειράματα όπου δοκιμάστηκε η διαδοχική βύθιση σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 90% και 100%, όπου η διαδοχική βύθιση δεν έδειξε διαφορά από την εφάπαξ σε 100% αιθανόλη). Από αυτό το πείραμα συμπεράναμε ότι το στέγνωμα πριν τη μονιμοποίηση είχε πολύ αρνητικές επιπτώσεις στην

τελική απεικόνιση (Εικόνα 5-2). Στις 9/9/13 λεμφοκύτταρα του Δότη 'Α' εκτέθηκαν σε 0, 1 και 2 Gy ακτινοβολίας-γ. Τελικώς όμως η μονιμοποίηση έγινε στα 140' μετά την ακτινοβολήση, ενώ ο στόχος ήταν τα 60'. Από αυτό το πείραμα προέκυψε ότι λόγω του υψηλού υπόβαθρου που παρουσίαζε στο κόκκινο χρώμα ( $\gamma$ -H2AX) η επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα από την ολονύκτια επώαση έπρεπε να μειωθεί.

### 5.2.2.2 Πειράματα σύμφωνα με το τελικό πρωτόκολλο

Τα πειράματα που ακολούθησαν, αφορούσαν τρεις υγιείς δότες εκτελέστηκαν σε διαφορετικές ημερομηνίες, και συνδυαζόμενα, λαμβάνοντας υπόψη τις όποιες ιδιαιτερότητες του κάθε ενός, έδωσαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια. Συγκεκριμένα, στις 18/9/13 λεμφοκύτταρα του Δότη 'Γ' ακτινοβολήθηκαν με πηγή -γ στα 0, 0.2, 0.5, 1 και 2 Gy. Η μονιμοποίηση έγινε στα 60' μετά την ακτινοβολήση. Στις 2/10/13 λεμφοκύτταρα του Δότη 'Γ' ακτινοβολήθηκαν με 0 και 1 Gy ακτινοβολίας-γ και αφέθηκαν να επιδιορθωθούν για 20', 6h, 12h, 24 h και 48h. Συγκεκριμένα το σημείο των 20' θεωρήθηκε ως τέτοιο, ενώ στην πραγματικότητα ο στόχος ήταν να είναι '0' h, δηλαδή να μονιμοποιηθεί όσο το δυνατόν γρηγορότερα μετά την ακτινοβολήση. Ο χρόνος που μεσολάβησε για αυτά τα κύτταρα, αφότου βγήκαν από τον πάγο μέχρι τη μονιμοποίηση, ήταν 50' και εφόσον η παρατήρηση στο μικροσκόπιο έδειξε ότι είχαν επαχθεί πολλές βλάβες, ο χρόνος αυτός δε μπορούσε να θεωρηθεί μηδενικός, και καθώς δεν είχαν μπει καθόλου στον κλίβανο θεωρήθηκε ότι αντιστοιχούν στα 20'. Στις 22/12/13 λεμφοκύτταρα του Δότη 'Α' εκτέθηκαν σε ακτίνες-γ 0, και 1 Gy, και αφέθηκαν να επιδιορθωθούν για 1, 6, 12 και 24 h. Επίσης ακτινοβολήθηκαν με 0.2 και 0.5 Gy και αφέθηκαν για 1 h, ώστε να υπάρχει αναλογία με τα λεμφοκύτταρα του Δότη 'Γ'. Διευκρινίζεται ότι όταν λέμε ότι αφέθηκαν για 1 h, εννοούμε ότι στον κλίβανο επωάζονται για 20' και θεωρώντας ότι η επιδιόρθωση των κυττάρων συνεχίζεται κατά τη διάρκεια του χειρισμού τους μέχρι τη μονιμοποίηση. Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα κύτταρα από τη στιγμή της ακτινοβολήσης, μπήκαν στον πάγο για 15' μέχρι να φτάσουν στον κλίβανο και τελικώς ο χρόνος από τη στιγμή της ακτινοβολήσης μέχρι τη στιγμή της έναρξης της μονιμοποίησης ήταν 75'. Στις 9/12/13 λεμφοκύτταρα του Δότη 'Ζ' ακτινοβολήθηκαν με 0 και 1 Gy (ακτίνες -γ) και αφέθηκαν να επιδιορθωθούν για 1, 6, 12, 24 και 48 h. Ομοίως και εδώ τα λεμφοκύτταρα που αποτελούν το πειραματικό σημείο της 1 h επωάστηκαν στον κλίβανο για 20', ενώ ο χρόνος που μεσολάβησε από τη στιγμή που μπήκαν στον κλίβανο έως την έναρξη της μονιμοποίησης ήταν 80'. Στις 16/01/14, στο Δότη 'Α' αφότου είχε λάβει αντιφλεγμονώδη επί δύο εβδομάδες έγινε αιμοληψία, για να ελεγχθεί εάν η όποια επίπτωση στην

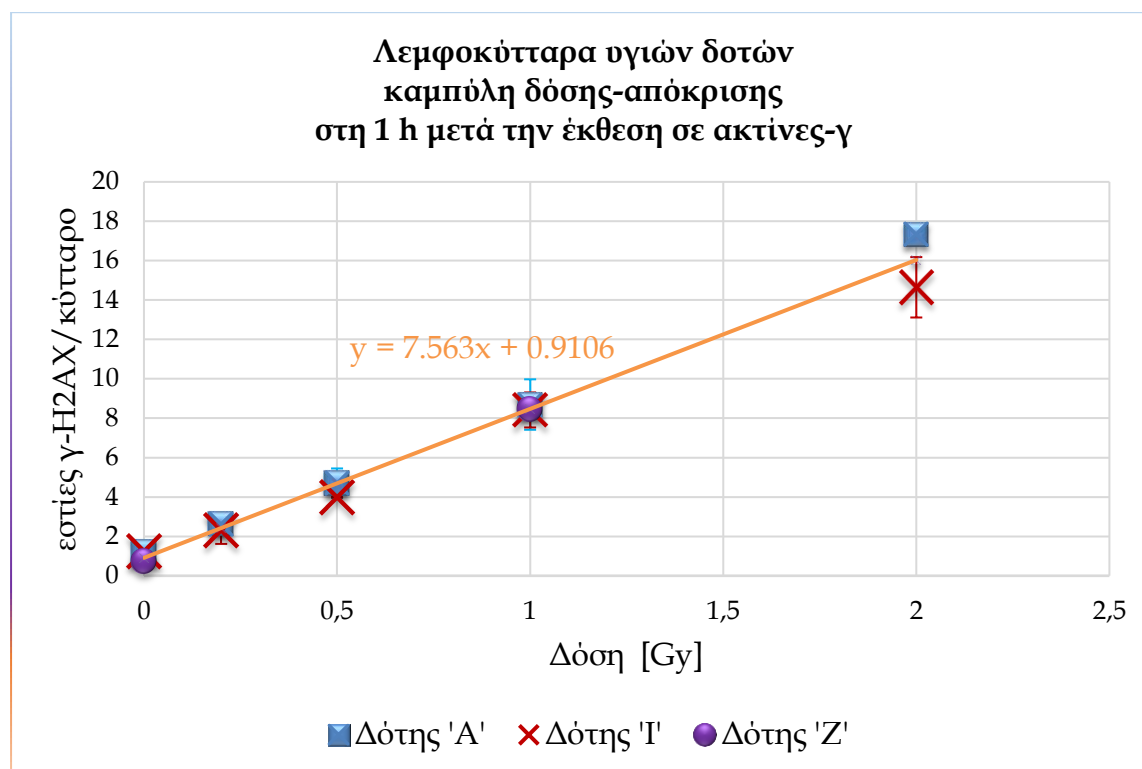


επιδιορθωτική ικανότητα των δίκλωνων θραύσεων είναι ανιχνεύσιμη με τη συγκεκριμένη μέθοδο, και εφόσον θα ήταν ανιχνεύσιμη θα γινόταν εκτίμηση της επίδρασης αυτής.

### 5.2.2.3 Καμπύλη δόσης -απόκρισης δίκλωνων θραύσεων DNA σε λεμφοκύτταρα εκτεθειμένα σε ακτίνες -γ

Συνδυαζόμενα τα πειράματα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο δίνουν την εξάρτηση της επαγωγής δίκλωνων θραύσεων από τη δόση ακτινοβολίας.

Η καμπύλη που περνά από τα σημεία είναι με καλή προσέγγιση ( $R^2=0.9863$ ) γραμμική, εάν κάνουμε μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων θεωρώντας ότι τα δεδομένα για όλους τους δότες είναι αποτελέσματα του ίδιου πειράματος ( $y=7.5042x + 0.9535$ ). Η καμπύλη που παρουσιάζεται εδώ έχει προκύψει και πάλι με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, αλλά για τον κάθε δότη χωριστά και ως συντελεστές έχουν θεωρηθεί οι μέσοι όροι των αντίστοιχων συντελεστών.



Γράφημα 5-5: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για λεμφοκύτταρα υγιών δοτών εκτεθειμένα σε ακτινοβολία -γ, στη 1 h μετά την ακτινοβολήση. Ο αριθμός των εστιών φθορισμού θεωρείται με αρκετή βεβαιότητα ότι ισοδυναμεί με τον αριθμό των ΔΚΘ DNA. Για το εύρος δόσεων που εξετάστηκε η εξάρτηση του αριθμού των ανιχνευόμενων ΔΚΘ είναι με καλή προσέγγιση γραμμική.

Η ευθεία που προέκυψε (Γράφημα 5-5) δίνει αριθμό εστιών ανά κύτταρο στο 1 Gy ίσο με 7,6 και αριθμό ενδογενών βλαβών 0,9 ανά κύτταρο. Υπενθυμίζεται στο σημείο αυτό ότι τα λεμφοκύτταρα που ακτινοβολήθηκαν προέρχονται από υγιείς δότες, άρα δεν έχουν επιπλέον αριθμό χρωμοσωμάτων, όπως συμβαίνει με τις καρκινικές σειρές που

παρουσιάζονται στα επόμενα. Επιπλέον τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος βρίσκονται ανά πάσα στιγμή στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου, επομένως δεν υπάρχει περίπτωση να βρίσκονται στη Σύνθεση ή να έχουν διπλασιάσει το DNA τους, όπως συμβαίνει με τα κύτταρα που παρουσιάζονται στη συνέχεια. Οι δύο αυτοί λόγοι κάνουν τα λεμφοκύτταρα να έχουν το μικρότερο αριθμό δίκλωνων θραύσεων για το 1 Gy ακτινοβολίας  $\gamma$ , σε σύγκριση με τα άλλα κύτταρα που εξετάζονται στη διατριβή.

Σημειώνεται ότι η εξάρτηση της δόσης με τον αριθμό των ΔΚΘ εξετάζεται στο χρονικό σημείο της 1 h μετά την έκθεση, διότι τότε οι εστίες φθορισμού εμφανίζουν το μέγιστο αριθμό τους.

#### *5.2.2.4 Επαγωγή και επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων DNA σε λεμφοκύτταρα εκτεθειμένα σε 1 Gy ακτίνων $\gamma$ (χρονική εξέλιξη)*

Για τη μελέτη της χρονικής εξέλιξης των ΔΚΘ DNA επιλέγεται η δόση του 1 Gy, η οποία γενικότερα στη βιβλιογραφία αποτελεί δόση αναφοράς, για όσους εργάζονται με ακτινοβολίες σχετιζόμενες με την ακτινοθεραπεία. Διευκρινίζεται στο σημείο αυτό, ότι η εξέταση των εστίων φθορισμού δεν ταυτίζεται απαραίτητως χρονικά με τις ίδιες τις βλάβες, αλλά κυρίως περιγράφει τη συμπεριφορά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η προσέγγιση του έμμεσου ανοσοφθορισμού εμπεριέχει αυτό το μειονέκτημα, αλλά εφόσον ο αναγνώστης είναι ενήμερος, δεν υπάρχει κίνδυνος σύγχυσης. Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, θα θεωρούμε ότι ταυτίζονται οι χρόνοι, ειδικότερα αυτή η παραδοχή μπορεί να γίνει για χρόνους μεγαλύτερους των 12 h. Αν εξεταστεί συγκεκριμένα το χρονικό σημείο της μιας ώρας παρατηρούμε ότι εκεί εμφανίζεται το μέγιστο, ενώ, όπως είναι αντιληπτό οι ίδιες οι βλάβες επάγονται τη στιγμή της ακτινοβολήσης, όμως οι εστίες φθορισμού χρειάζονται χρόνο για να σχηματιστούν, ακριβώς επειδή αντικατοπτρίζουν την επιδιόρθωση που επιχειρεί το κύτταρο ως απόκριση στην επαχθείσα βλάβη. Βεβαίως, όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος της διατριβής, νέες δευτερογενείς βλάβες επάγονται κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας, ως αποτέλεσμα της επιδιόρθωσης άλλων βλαβών που επισυμβαίνουν στην ίδια γειτονιά του DNA, όπως βλάβες βάσεων που επιδιορθώνονται με το Μηχανισμό Εκτομής Βάσης ή το Μηχανισμό Εκτομής Νουκλεοτιδίων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 5-6**. Η μελέτη της συνάρτησης αυτής είναι αρκετά περίπλοκη στη μαθηματική περιγραφή της ώστε να εκφράζει ρητά τα επί μέρους βιολογικά φαινόμενα. Σχετικά απλούστερη είναι η περιγραφή που θεωρεί ως στιγμή μηδέν τη στιγμή που οι εστίες έχουν φτάσει στο μέγιστο.

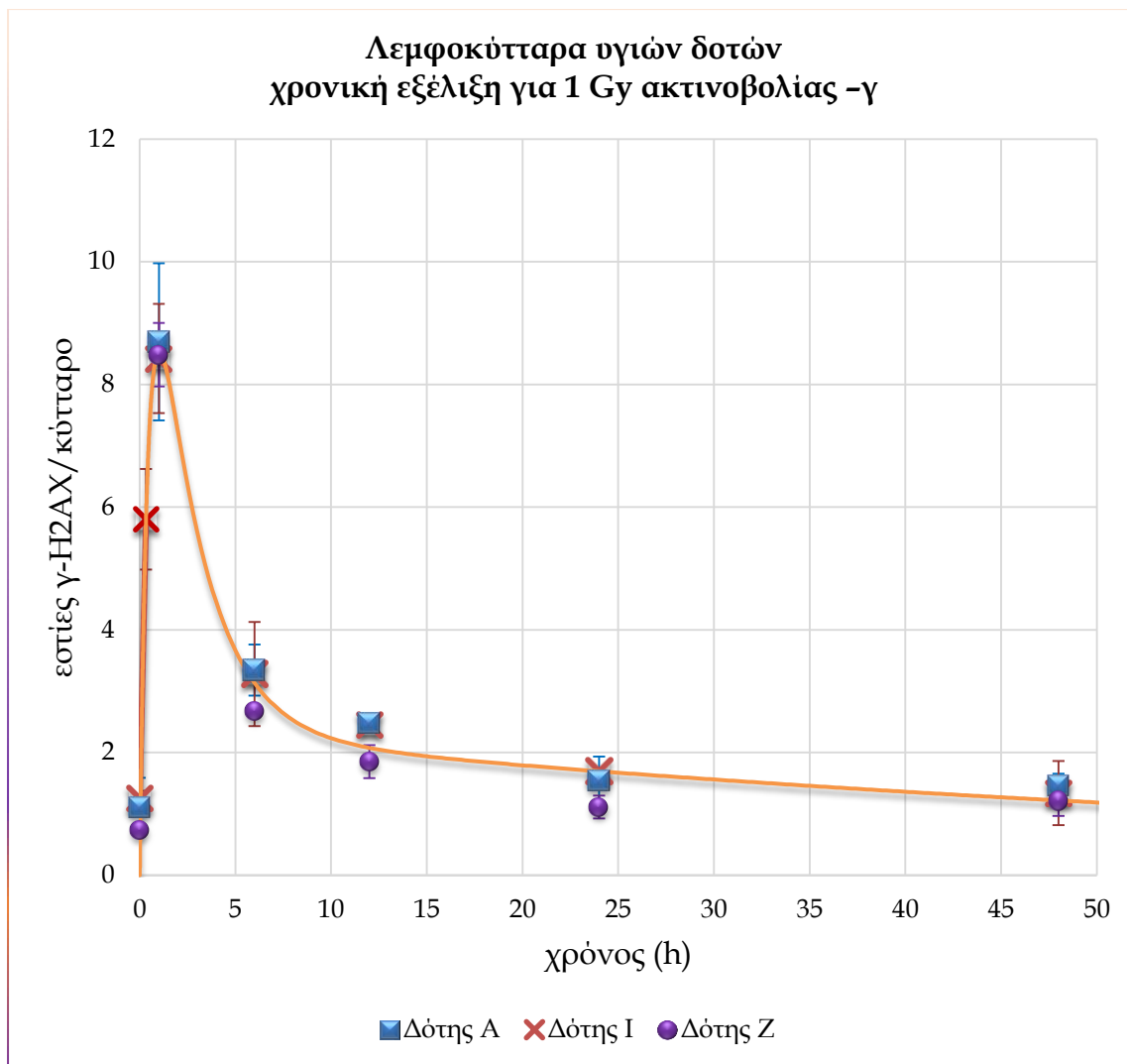
Στην περίπτωση αυτή, ήτοι στην περίπτωση που εξετάζεται η επιδιόρθωση των ΔΚΘ, σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι υπακούει στην εκθετική μείωση. Όμως εδώ επιχειρούμε να περιγράψουμε όλη τη διαδικασία, ξεκινώντας από τη στιγμή της ακτινοβολήσης. Για το λόγο αυτόν, ονομάζουμε την καμπύλη ως «χρονική εξέλιξη» και όχι απλώς ως «επιδιόρθωση». Στη βιβλιογραφία συναντώνται οι περιγραφές των Cucinotta *et al* [127] και των Taleei and Nikjoo [128], οι οποίες όμως λαμβάνουν υπόψη πλήθος πειραμάτων, ώστε να προσδιορίσουν τις πολλές παραμέτρους που χρησιμοποιούν. Στην παρούσα διατριβή ακολουθείται η περιγραφή των Mariotti *et al* [129], η οποία είναι σχετικά απλούστερη, και για την οποία κατορθώσαμε να αναπαράγουμε με ικανοποιητική ακρίβεια το μοντέλο και να προσδιορίσουμε τους συντελεστές, οι οποίοι είναι μόλις 5 τον αριθμό.

Σύμφωνα λοιπόν με τους Mariotti *et al*, το μοντέλο που περιγράφει τη χρονική εξέλιξη του αριθμού των εστιών γ-H2AX με το χρόνο, για μία, οξεία έκθεση, δίνεται από την ακόλουθη συνάρτηση:

$$N(t) = A(1 - e^{-Bt})(Ce^{-Dt} + (1 - C)e^{-Et})$$

Όπου ο όρος  $N(t) = A(1 - e^{-Bt})$  εκφράζει τη δημιουργία των εστιών, μέχρις του σημείου κορεσμού. Πρόκειται για μία γνησίως αύξουσα, ασυμπτωτική σχέση, με άνω φράγμα το  $A$ , όπου φυσικά θεωρούμε ως πεδίο ορισμού το  $[0, +\infty)$ . Η μεταβολή του  $B$ , έχει ως επίδραση τη χρονική μετατόπιση του μεγίστου. Και συγκεκριμένα η αύξηση του  $B$  μετακινεί τη θέση του μεγίστου νωρίτερα στο χρόνο.

Ο όρος  $N(t) = (Ce^{-Dt} + (1 - C)e^{-Et})$  εκφράζει την απομείωση των εστιών με το χρόνο. Έχουν ληφθεί υπόψη δύο φάσεις της διαδικασίας απόσβεσης των εστιών, μία γρήγορη και μία αργή. Η γρήγορη διαδικασία εκφράζει την επιδιόρθωση των απλών ΔΚΘ ενώ η αργή συνδέεται με τις σύνθετες ΔΚΘ. Η παράμετρος ' $C$ ' είναι ο συντελεστής βαρύτητας των απλών ΔΚΘ, οι οποίες έχουν ρυθμό απόσβεσης ' $D$ ', ενώ ο όρος  $(1-C)$  είναι ο συντελεστής βαρύτητας των σύνθετων ΔΚΘ, με αντίστοιχο ρυθμό απόσβεσης το ' $E$ '.



Γράφημα 5-6: Περιγραφή της χρονικής εξέλιξης, επαγωγή και επιδιόρθωση των ΔΚΘ που επάγονται από 1 Gy ακτινοβολίας -γ. Εξετάζεται η συμπεριφορά των σχηματιζόμενων εστιών φθορισμού για την πρωτεΐνη επιδιόρθωσης γ-H2AX.

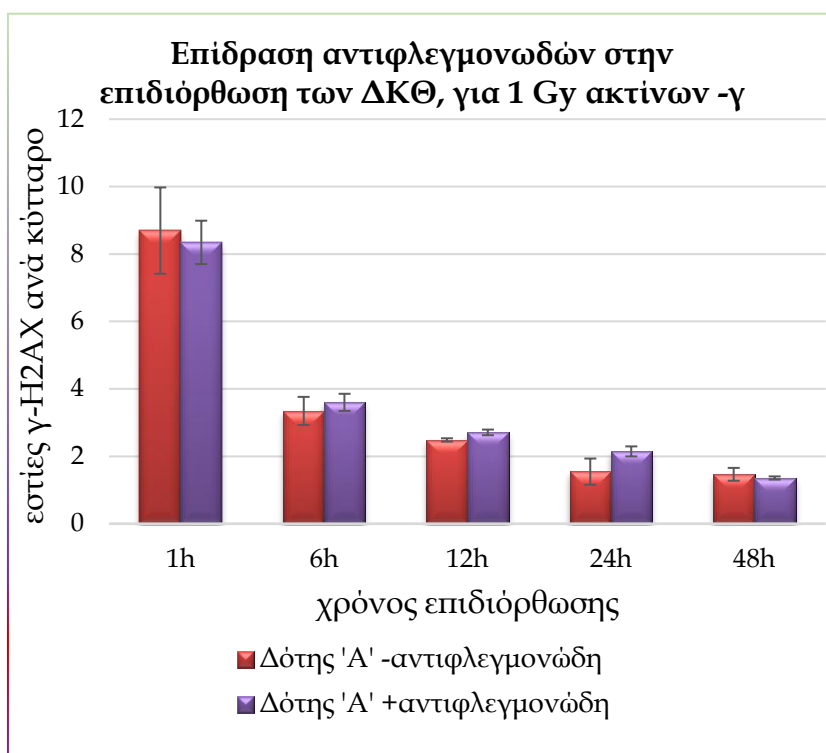
Για την αναπαραγωγή του μοντέλου έγινε χρήση του λογισμικού Origin Pro 9.0, όπου για το **Γράφημα 5-6**, έδωσε πολύ ικανοποιητική προσέγγιση ( $R^2 = 0.95$ ), χωρίς ιδιαίτερη οδήγηση στις παραμέτρους. Για την εξαγωγή της συνάρτησης έγινε η προσαρμογή των δεδομένων στη συνάρτηση, αξιοποιώντας όλα τα πειραματικά σημεία και από τους τρεις δότες σε μία γραφική παράσταση.

$$N(t) = 14.0938(1 - e^{-1.87919t})(0.83305e^{-0.412624t} + 0.16695e^{-0.0137t})$$

Σημειώνεται ότι για τα πειραματικά σημεία του **Γραφήματος 5-6**, στο χρόνο μηδέν θεωρήσαμε τα αντίστοιχα μη ακτινοβολημένα δείγματα.

### 5.2.2.5 Μελέτη της επίδρασης αντιφλεγμονωδών στην επιδιορθωτική ικανότητα των ΔΚΘ

Συνδυαζόμενα τα πειραματικά αποτελέσματα για το Δότη 'Α', δίνουν την επίδραση αντιφλεγμονωδών στην επιδιόρθωση των ΔΚΘ. Προέκυψε το **Γράφημα 5-7**. Από το στατιστικό έλεγχο (student's t-test με δύο ουρές και άνιση διακύμανση) μεταξύ των συνθηκών (-/+ αντιφλεγμονώδη) για το κάθε χρονικό σημείο, δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, εκτός από το σημείο των 24 h, αποτέλεσμα που δε θεωρείται αξιολογήσιμο. Το συμπέρασμα είναι ότι για τις χαμηλές, θεραπευτικές -για κρυολόγημα- δόσεις η όποια επίδραση των αντιφλεγμονωδών δεν ανιχνεύτηκε με το δεδομένο πείραμα.



*Γράφημα 5-7: Μελέτη της επίδρασης αντιφλεγμονωδών φαρμάκων στην επιδιορθωτική ικανότητα του κυττάρου ως προς τις ΔΚΘ. Εξετάστηκαν πειράματα που αφορούσαν έναν δότη. Καθώς ο στατιστικός έλεγχος δεν έδωσε σημαντικές διαφορές, η όποια επίδραση δεν ανιχνεύτηκε. Το βέβαιον είναι ότι η επίδραση είναι πολύ μικρή για τις μικρές δόσεις φαρμάκου που έλαβε ο Δότης 'Α'.*

Αν κανείς θέλει να επαναλάβει ένα τέτοιου είδους πείραμα θα πρέπει να αυξήσει κατά πέντε με δέκα φορές τον αριθμό των κυττάρων που θα μετρήσει για το κάθε πειραματικό σημείο, τόσο για τη συνθήκη χωρίς αντιφλεγμονώδες, πριν την έναρξη της λήψης, όσο και για τη συνθήκη την αμέσως μετά τη λήψη. Στα συγκεκριμένα πειράματα είχαν καταμετρηθεί 200 κύτταρα για κάθε πειραματικό σημείο.

### 5.2.2.6 Συγκριτική μελέτη της χρονικής εξέλιξης για τις δόσεις 1 Gy και 2 Gy ακτίνων $\gamma$

Από την προηγούμενη ανάλυση προέκυψε ότι η όποια επίδραση των αντιφλεγμονωδών δεν έγινε ανιχνεύσιμη από το πείραμα που διεξήχθη στις 16/01/14, επομένως μπορούμε να θεωρήσουμε αμελητέα την επίδραση των αντιφλεγμονωδών στον αριθμό των εστιών φθορισμού που επάγονται και να αξιοποιήσουμε τα αποτελέσματα για να δοκιμάσουμε το μοντέλο της χρονικής εξέλιξης που προσδιορίσαμε σε προηγούμενη παράγραφο.

Το μοντέλο ήταν το εξής:

$$N(t) = A(1 - e^{-Bt})(Ce^{-Dt} + (1 - C)e^{-Et})$$

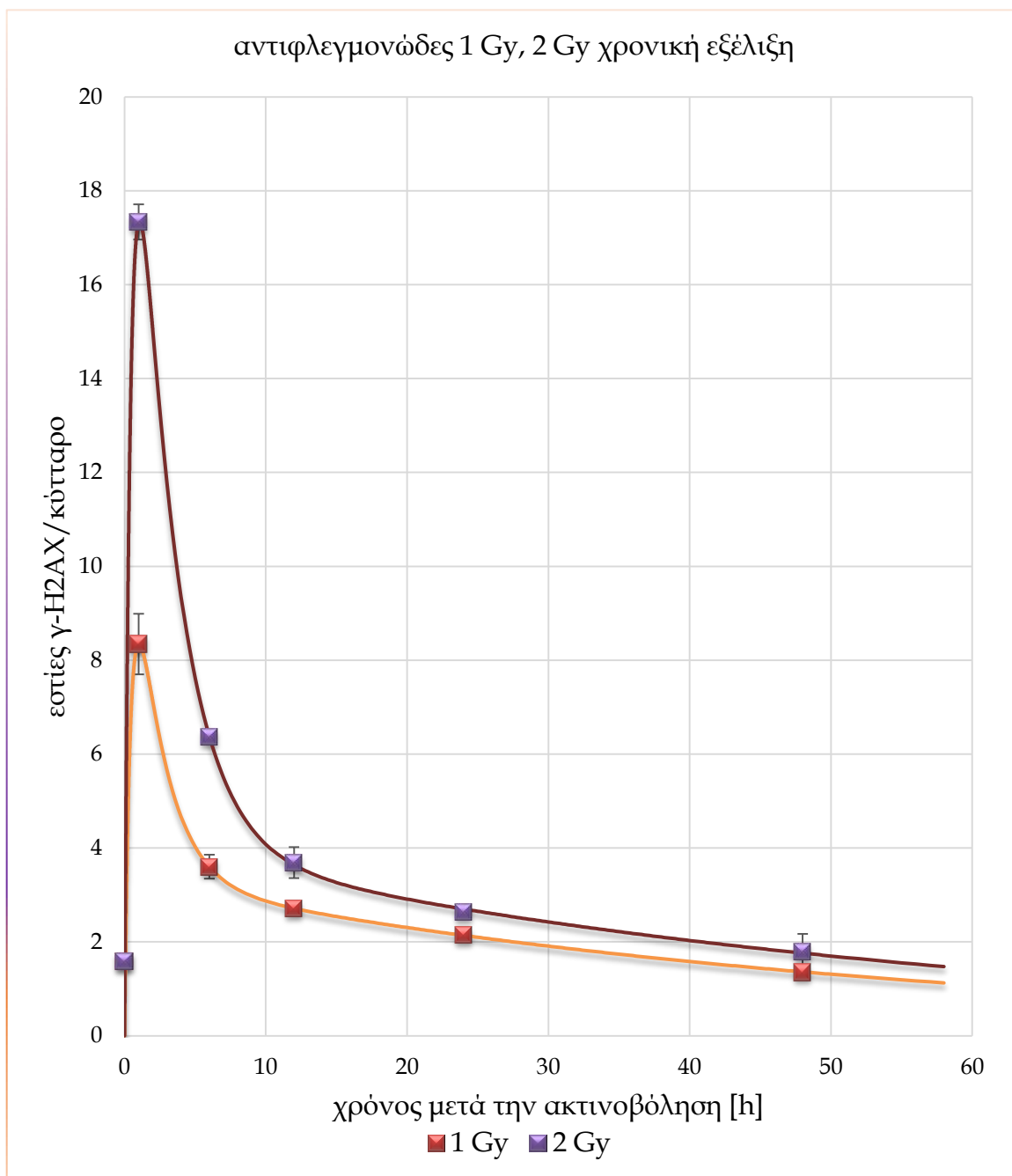
Και πάλι με τη βοήθεια του Origin Pro 10, προσδιορίσαμε τους συντελεστές. Αυτή τη φορά το πρόβλημα ήταν πιο περίπλοκο λόγω των λίγων πειραματικών σημείων. Επομένως έπρεπε το λογισμικό να οδηγηθεί με αρχικοποίηση των παραμέτρων. Από τη διερεύνηση της συνάρτησης προέκυψαν οι περιορισμοί  $0 < C < 1$  και  $D > E$ , συν το ότι η θέση του μεγίστου στη μία ώρα δίνει τιμή στο  $B = 3,9$ . Με αυτά υπόψη, καθώς και άλλες παρατηρήσεις από πολλαπλές δοκιμές, προέκυψαν οι τιμές για την αρχικοποίηση των παραμέτρων στο λογισμικό, και από αυτές προέκυψαν οι καμπύλες:

Για το 1 Gy ακτινοβολίας:

$$N(t) = 13,931(1 - e^{-1,879t})(0,7589e^{-0,478t} + 0,24109e^{-0,01883t})$$

Για τα 2 Gy ακτινοβολίας:

$$N(t) = 27,7116(1 - e^{-1,879t})(0,85099e^{-0,36309t} + 0,1490e^{-0,01776t})$$



Γράφημα 5-8: Συγκριτική μελέτη της χρονικής εξέλιξης των εστιών φθορισμού γ-H2AX, μεταξύ του 1 Gy και των 2 Gy ακτίνων γ. Τα κύτταρα του πειράματος είναι λεμφοκύτταρα υγιούς δότη, μετά από λήψη αντιφλεγμονωδών. Καθώς η επίδραση βρέθηκε να είναι αμελητέα, μπορεί να γίνει η σύγκριση μεταξύ των παρουσιαζόμενων συνθηκών. Η προσαρμογή των καμπύλων έγινε σύμφωνα με το μοντέλο των Mariotti et al.

Η παρατήρηση των δύο προηγούμενων εξισώσεων δίνει εντυπωσιακά συμπεράσματα που ενισχύουν την επιτυχία της προσέγγισης. Αρχικά συγκρίνοντας το συντελεστή 'Α', ο οποίος κατά κύριο λόγο βαρύνει στην τιμή του μεγίστου, παρατηρούμε ότι η δόση των 2 Gy έχει περίπου διπλάσια τιμή από όσο για το 1 Gy. Ενδιαφέρον προκαλεί και η συμφωνία

των συντελεστών 'D' και 'E', όπου στα 2 Gy παίρνουν μικρότερες τιμές σε σύγκριση με το 1 Gy. Εφόσον εκφράζουν το ρυθμό αποφωσφορυλίωσης της  $\gamma$ -H2AX και κατ' επέκταση το βαθμό επιδιόρθωσης των ΔΚΘ, για τα 2 Gy ακτινοβολίας ο ρυθμός επιδιόρθωσης τόσο για τις σύνθετες, όσο και τις απλές ΔΚΘ είναι μικρότερος σε σύγκριση με το 1 Gy.



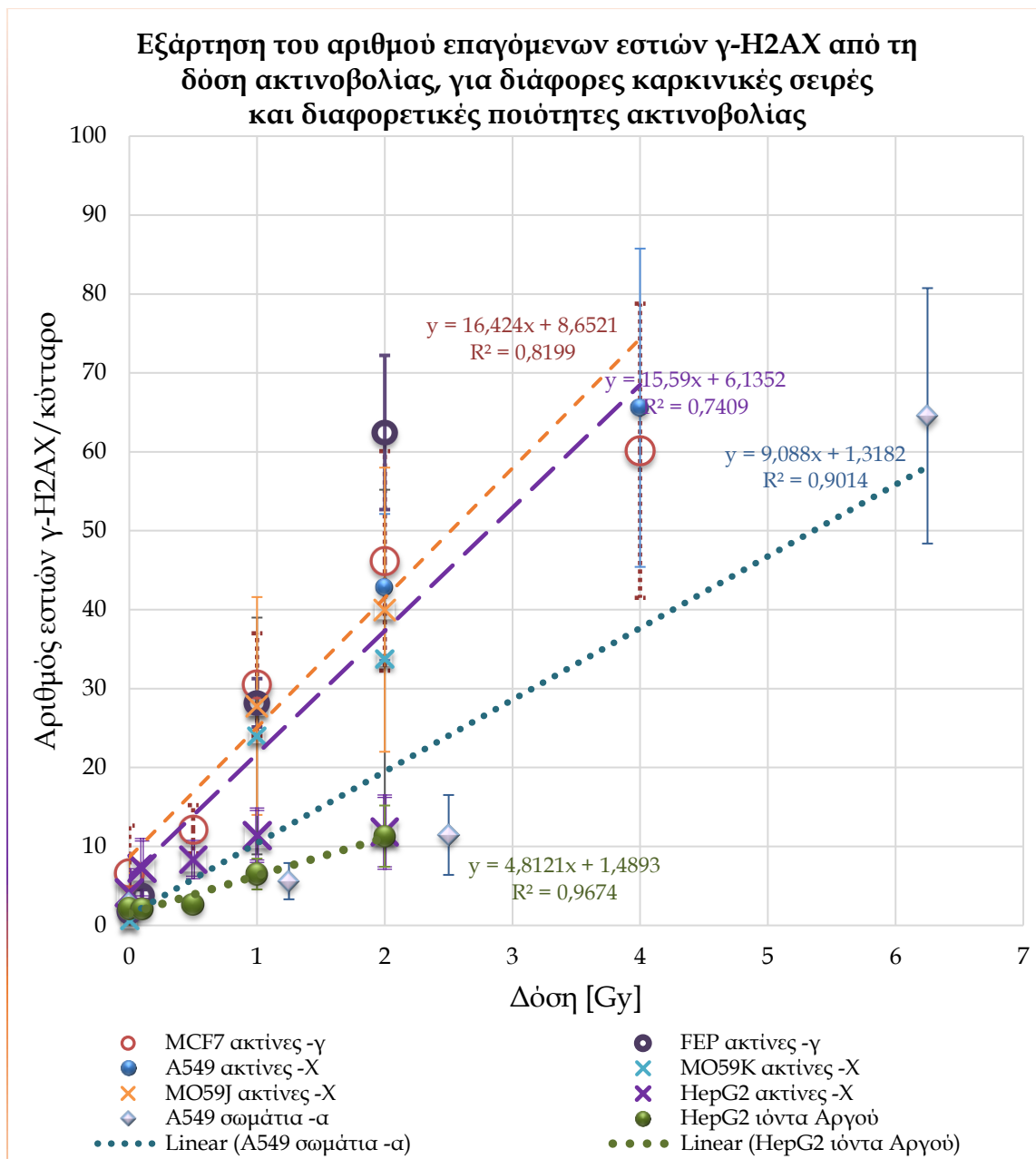
### 5.2.3 Καμπύλες δόσης-απόκρισης εστιών γ-H2AX σε διάφορες καρκινικές σειρές κυτταρικές σειρές και είδη ακτινοβολίας

Παρουσιάζονται εδώ αποτελέσματα προερχόμενα από πολλά διαφορετικά πειράματα για να δοθεί μια συνολική εικόνα για την εξάρτηση του αριθμού των επαγόμενων εστιών φθορισμού γ-H2AX από τη δόση, για διαφορετικές ποιότητες ιοντιζουσας ακτινοβολίας σε διάφορες καρκινικές σειρές. Ο λόγος σύμπτυξης των αποτελεσμάτων είναι για να μπορεί να ιδωθεί μια συνολική εικόνα και να μελετηθούν συγκριτικά τα διάφορα είδη ακτινοβολίας. Το **Γράφημα 5-9** περιλαμβάνει αποτελέσματα που προέρχονται από κύτταρα MCF7 εκτεθειμένα σε ακτίνες -γ ( $^{60}\text{Co}$ , ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»), FEP18-11-T1 σε ακτίνες -γ ( $^{137}\text{Cs}$ , Αυστραλία), HepG2 εκτεθειμένα σε ακτίνες -X (σωλήνας X-Strahl, Κολωνία), A549, MO59K, MO59J ακτινοβολημένα με -X (σωλήνας Seiref-Pantak, Έσσεν), A549 σε σωματία -α ( $^{241}\text{Am}$ , Έσσεν), HepG2 με ιόντα Αργού (επιταχυντής GANIL, Γαλλία) Οι καμπύλες έχουν προσαρμοστεί λαμβάνοντας υπόψη όλα τα πειραματικά δεδομένα, από τις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, για κάθε ποιότητα ακτινοβολίας, μαζί. Δηλαδή για τις ακτίνες -γ συμπεριελήφθησαν τα σημεία για τα κύτταρα MCF7 και FEP18-11-T1. Για τις ακτίνες -x ελήφθησαν υπόψη τα δεδομένα που αφορούν τα κύτταρα A549, MO59K και FEP18-11-T1. Για τα σωματία -α τα μόνα διαθέσιμα κύτταρα ήταν τα A549, ομοίως και για τα ιόντα Αργού, τα δεδομένα προέρχονται από μία κυτταρική σειρά, την HEPG2.

*Πίνακας 5-5 Συνολπική παρουσίαση των πειραμάτων που περιλαμβάνει το Γράφημα 5-9. Τα πειράματα έχουν καταταχθεί με αυξανόμενη γραμμική εναπόθεση ενέργειας (LET), της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.*

Κύτταρα	ακτινοβολία	πηγή	LET [keV/μm]
MCF7	ακτίνες -γ	$^{60}\text{Co}$	0.3
FEP18-11-T1	ακτίνες -γ	$^{137}\text{Cs}$	0.91
HepG2	ακτίνες -X	X-Strahl	0.3-3
A549, MO59K, MO59J	ακτίνες -X	Seiref-Pantak	2
A549	σωμάτια -α	$^{241}\text{Am}$	116
HepG2	ιόντα Αργού	GANIL (επιταχυντής)	270

Λαμβάνοντας υπόψη της τιμές της LET που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5-5**, παρατηρούμε ότι αυξανόμενης της γραμμικής εναπόθεσης ενέργειας (LET) κάθε ακτινοβολίας, η αντίστοιχη



Γράφημα 5-9: Εξάρτηση του αριθμού επαγόμενων εστιών γ-H2AX από τη δόση ακτινοβολίας, για διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και διαφορετικές ποιότητες ακτινοβολίας. Οι καμπύλες έχουν προσαρμοστεί λαμβάνοντας υπόψη όλα τα πειραματικά δεδομένα, από τις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, για κάθε ποιότητα ακτινοβολίας, μαζί. Δηλαδή για τις ακτίνες -γ συμπεριλήφθησαν τα σημεία για τα κύτταρα MCF7 και FEP18-11-T1. Για τις ακτίνες -x ελήφθησαν υπόψη τα δεδομένα που αφορούν τα κύτταρα A549, MO59K και FEP18-11-T1. Για τα σωματία -α τα μόνα διαθέσιμα κύτταρα ήταν τα A549, ομοίως και για τα ιόντα Αργού, τα δεδομένα προέρχονται από μία κυτταρική σειρά, την HEPG2.

ευθεία του **Γραφήματος 5-9** έχει όλο και μικρότερη κλίση. Δηλαδή, ισοδύναμα για δεδομένη δόση ακτινοβολίας ο αριθμός των παρατηρούμενων εστιών φθορισμού γ-H2AX, αυξανόμενης της LET, ολοένα και μειώνεται.

Τούτο συμβαίνει διότι καθώς αυξάνεται η LET μία τροχιά δημιουργεί περισσότερες της μιας ΔΚΘ σε κοντινή απόσταση, οπότε και οι παρατηρούμενες εστίες είναι μεγαλύτερες, επομένως ο αριθμός τους δεν αντιστοιχεί πλέον '1-1' με τις ΔΚΘ. «Κάτω» από μία εστία συνυπάρχουν περισσότερες ΔΚΘ.

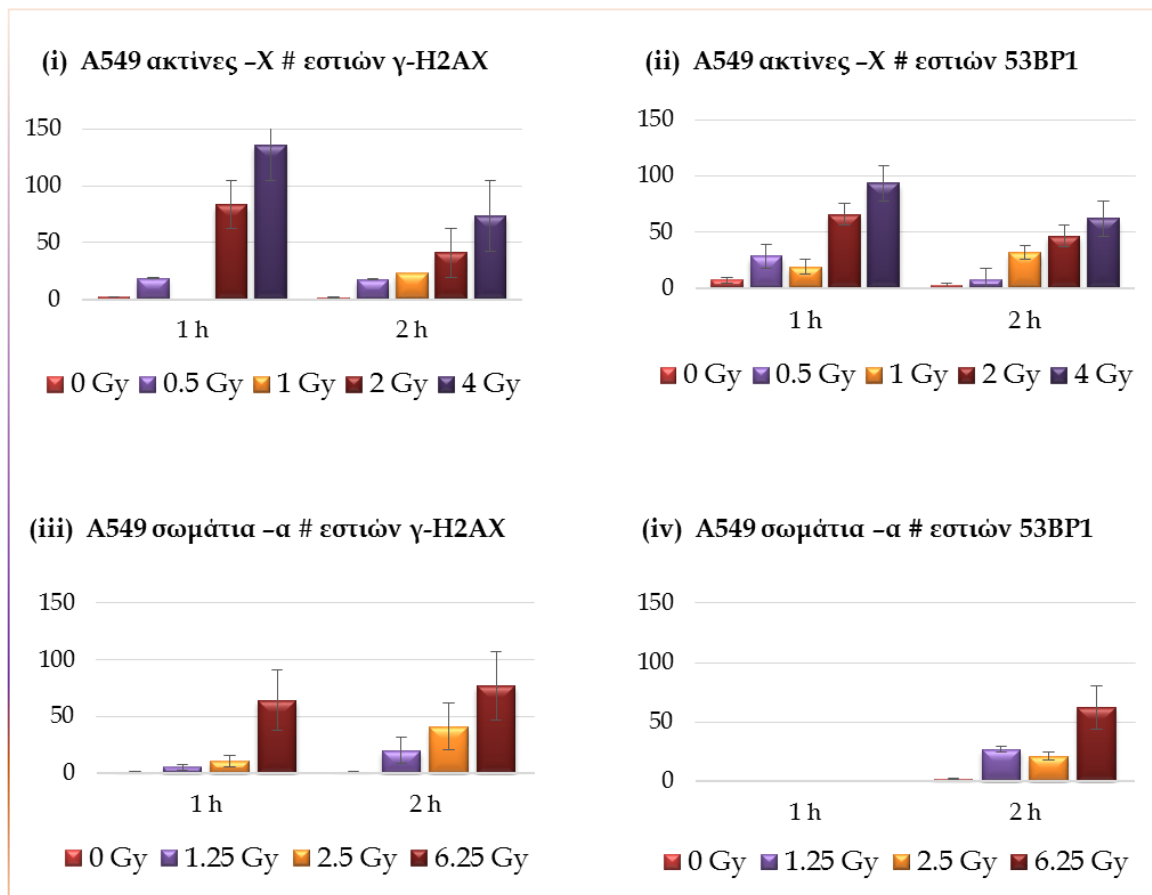
Σημειώνεται ότι η προσαρμογή των ευθειών στην περίπτωση των ακτίνων  $\gamma$  και  $X$  δεν θεωρείται ιδιαίτερα ικανοποιητική, έχουν  $R^2$  ίσο με 0,81 και 0,74 αντίστοιχα και αυτό συμβαίνει λόγω των πολλών διαφορετικών πειραμάτων και συνθηκών που συνδυάστηκαν ώστε αυτές να προκύψουν.

Επίσης δε θεωρούνται ικανοποιητικές οι τιμές που δίνουν οι καμπύλες αυτές για τα επίπεδα ενδογενών βλαβών, καθώς παρουσιάζουν μεγάλες μη αναμενόμενες τιμές. Αυτό ερμηνεύεται και από την προσαρμογή καμπύλης που δεν είναι ικανοποιητική, συν το γεγονός ότι κάποια κύτταρα είχαν όντως μεγάλο αριθμό εστιών στο μη ακτινοβολημένα, δηλαδή τα κύτταρα είχαν υποστεί κάποιο άλλου είδους στρες εκτός από την ακτινοβολία.

#### **5.2.4 Επαγωγή ΔΚΘ σε διάφορες δόσεις σε καρκινικά κύτταρα A549 για σωματία $\alpha$ και ακτίνες $X$**

Ακολουθεί η παρουσίαση ενός πειράματος που έγινε σε κύτταρα A549 ακτινοβολημένα με διάφορες δόσεις ακτίνων  $X$  ή σωματίων  $\alpha$ . Εξετάζονται οι αριθμοί των επαγόμενων εστιών φθορισμού για τις επιδιορθωτικές πρωτεΐνες  $\gamma$ -H2AX και 53BP1, στη 1 και στις 2 h μετά την ακτινοβολήση. Παρατηρούμε για τις ακτίνες  $X$  (**Γράφημα 5-10, i & ii**) ότι και οι δύο πρωτεΐνες επιδιόρθωσης  $\gamma$ -H2AX και 53BP1 έχουν μειώσει τα επίπεδά τους, για κάθε δόση ακτινοβολίας στις δύο ώρες. Συγκρίνοντας στο ίδιο γράφημα τα πλαίσια **i & ii**, παρατηρούμε ότι ενώ στο **(i)** ο αριθμός των εστιών  $\gamma$ -H2AX ακολουθεί μια γραμμικότητα, στο πλαίσιο **(ii)** ο αριθμός των εστιών 53BP1 δεν ακολουθεί τη γραμμικότητα, στα 4 Gy. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η  $\gamma$ -H2AX δεν έχει ενδογενή συγκέντρωση αλλά φωσφορυλιώνεται δηλ. επάγεται μετά την ανίχνευση της δίκλωνης βλάβης. Όμως η 53BP1 υπάρχει ενδογενώς στο κύτταρο και για δόσεις μεγάλες ( $>2$  Gy) φαίνεται ότι τα επίπεδά της δεν επαρκούν για να σχηματίσουν ευμεγέθεις εστίες γύρω από κάθε βλάβη. Οι εμφανιζόμενες εστίες είναι μικρότερες, με αποτέλεσμα ο αριθμός τους να υποεκτιμάται όταν η ανάλυση γίνεται με κάποιο λογισμικό. Θυμίζουμε σε αυτό το σημείο, ότι για την όποια ανάλυση με λογισμικό, ή χωρίς λογισμικό (με το μάτι), πριν αρχίσει η ανάλυση πρέπει να παρθεί η απόφαση για το τι θα ονομάζουμε εστία φθορισμού και τι θα θεωρούμε ως υπόβαθρο. Ένα βασικό κριτήριο για τις εστίες είναι το μέγεθός τους, άλλο κριτήριο

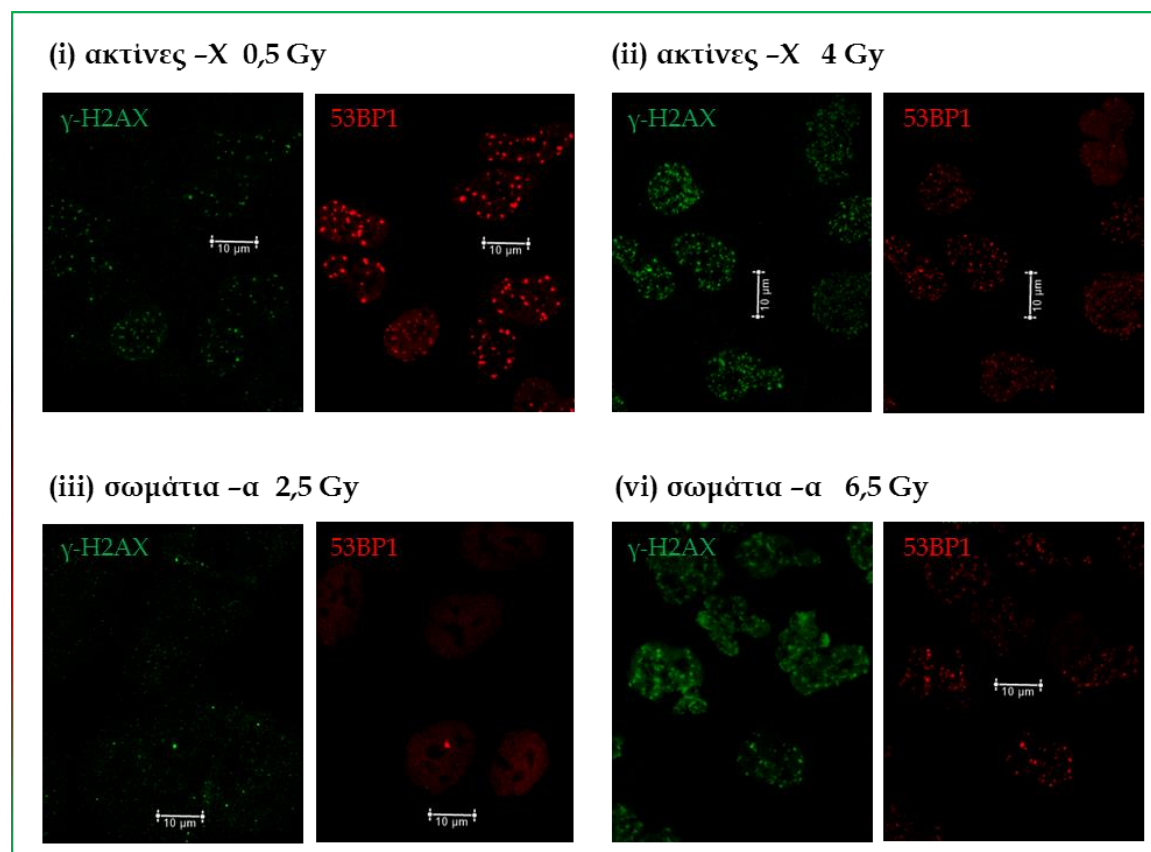
είναι η ένταση φθορισμού και ένα τρίτο μπορεί να είναι το κατά πόσο διαφέρουν σε φωτεινότητα (%) από το σήμα υποβάθρου, ή από τη μέση ένταση όλης της εικόνας. Έτσι λοιπόν παρατηρούμε ότι χάνεται η γραμμικότητα για την πρωτεΐνη 53BP1. Συγκρίνοντας το πλαίσιο (ii) με το (i) της Εικόνας 5-3, παρατηρούμε ότι οι σχηματιζόμενες εστίες της 53BP1 είναι μικρότερες για τα 4 Gy από όσο για τα 0,5 Gy. Οι αντίστοιχες εικόνες για τη  $\gamma$ -H2AX δε μεταβάλλουν το μέγεθός τους. Τα ίδια συμβαίνουν και για τα σωμάτια -α όσον αφορά την πρωτεΐνη 53BP1. Ενδιαφέρον προκαλεί η εικόνα της  $\gamma$ -H2AX στα 6,5 Gy (σωμάτια -α) Εικόνα 5-3<sup>iv</sup>.



Γράφημα 5-10: Εξάρτηση των επαγόμενων εστιών φθορισμού από τη δόση ακτινοβολίας, σε κύτταρα A549.(i & ii) ακτίνες -X, (iii & iv) σωμάτια -α, (i & iii) για την πρωτεΐνη  $\gamma$ -H2AX και (ii & iv) για την πρωτεΐνη 53BP1.

Οι βλάβες είναι πλέον τόσες πολλές και πυκνές, που η  $\gamma$ -H2AX παρουσιάζει διάχυση, και όχι καλώς ορισμένες εστίες. Η 53BP1, για αυτή τη μεγάλη δόση, δεν επαρκεί και σχηματίζει πολλές και μικρές εστίες. Οπότε με το πείραμα αυτό προσδιορίζουμε και τα όρια της συγκεκριμένης τεχνικής, αφού πλέον οι πρωτεΐνες δεν επαρκούν ούτε μπορούν να ανταποκριθούν σχηματίζοντας εστίες ώστε να γινόταν η καταμέτρηση που θα αντιστοιχούσε τις εστίες με τις επαγόμενες δίκλωνες θραύσεις DNA.

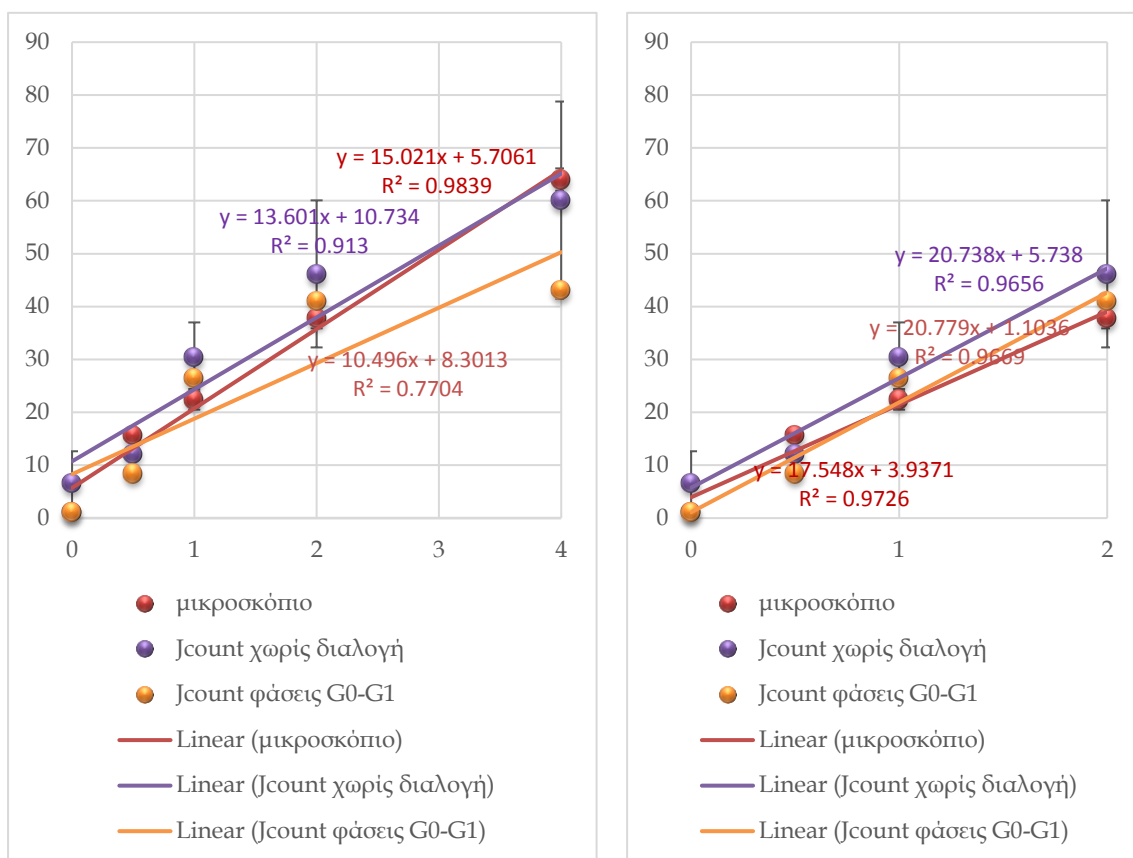
Σημειώνεται, τέλος, ότι η ενδογενής συγκέντρωση της 53BP1 είναι ορατή στο πλαίσιο **(iii)** της **Εικόνας VI-3**, όπου φαίνεται μία ασθενής χρώση να καλύπτει ολόκληρο τον πυρήνα.



Εικόνα 5-3: Κότταρα A549 ακτινοβολημένα με ακτίνες -X ή σωμάτια -α στη 1 h μετά την έκθεση. Έχουν χρωσθεί οι πρωτεΐνες  $\gamma$ -H2AX και 53BP1. Τμήματα εικόνων από συννεστικό μικροσκόπιο, όπου έχει γίνει προβολή μέγιστης έντασης από τις διάφορες 'τομές' του άξονα Z. (i & ii) ακτίνες -X 0,5 και 4 Gy αντίστοιχα. (iii & iv) σωμάτια -α 2,5 και 6,5 Gy αντίστοιχα.

### 5.2.5 Καμπύλη δόσης-απόκριση για καρκινικά κώτταρα MCF7 εκτεθειμένα σε ακτίνες- $\gamma$

Παρουσιάζεται εδώ ένα πείραμα με κώτταρα MCF7, όπου η εξάρτηση του αριθμού των εμφανιζόμενων εστιών  $\gamma$ -H2AX προσεγγίζεται με τρεις μεθόδους. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης από το μικροσκόπιο, δηλαδή εκτίμηση «με το μάτι». Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη χρήση του λογισμικού Jcount και τέλος, πάλι από τα αποτελέσματα του λογισμικού, γίνεται μία επιπλέον διόρθωση, προσπαθώντας να διαχωρίσουμε τα κώτταρα ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονταν.



Γράφημα 5-11: Εξάρτηση του αριθμού των εστιών  $\gamma$ -H2AX από τη δόση ακτινοβολίας, σε κύτταρα MCF7 εκτεθειμένα σε ακτίνες  $-\gamma$ . Για το ίδιο πείραμα οι εστίες καταμετρούνται με τρεις τρόπους. Αρχικά καταγράφονται οι μετρήσεις από το μικροσκόπιο. Στη συνέχεια γίνεται ανάλυση των εικόνων με το λογισμικό Jcount. Ακολούθως τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το λογισμικό περαιτέρω αναλύονται ως προς τη φάση του κυτταρικού κύκλου.

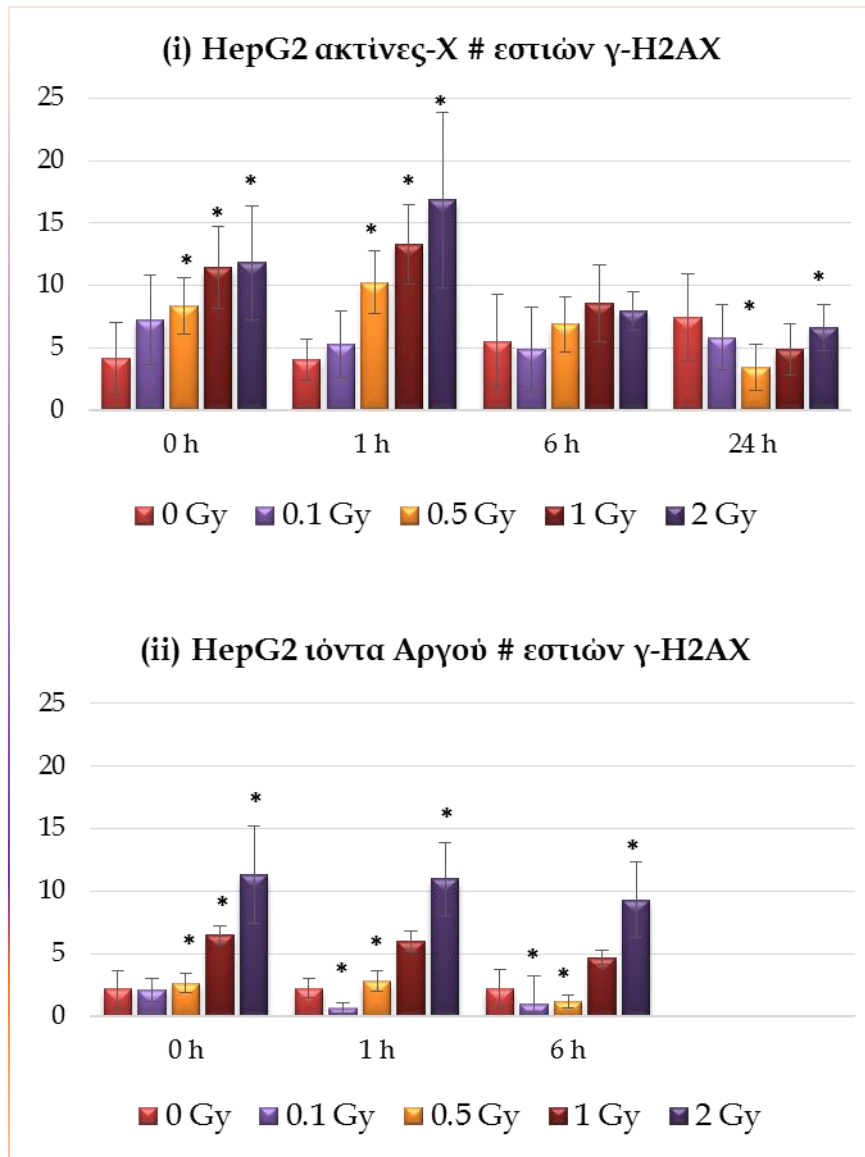
Παρατηρούμε ότι και με τις τρεις μεθόδους καταμέτρησης χάνεται η γραμμικότητα στα 4 Gy, χωρίς αυτό να κατοχυρώνει ότι χάνεται και στην πραγματικότητα η γραμμικότητα του φαινομένου. Στην παρατήρηση από το μικροσκόπιο, χάνεται η γραμμικότητα, καθώς ο παρατηρητής έχει την τάση να καταμετρά τα όχι και πολύ μεγάλα κύτταρα για να μετρήσει λιγότερες εστίες. Μέχρι τα 2 Gy, όλες οι μέθοδοι καταφέρνουν να αποδώσουν τη γραμμικότητα του φαινομένου. Το πρόβλημα με τα 4 Gy εμφανίζεται λόγω της φύσης της απεικόνισης. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικροσκόπιο επιφθορισμού, με αποτέλεσμα για κάθε οπτικό πεδίο να λαμβάνεται μία εικόνα, δηλαδή ένα εστιακό επίπεδο. Αν και από την πειραματική διαδικασία έγινε προσπάθεια να αφυδατωθούν τα κύτταρα ώστε να γίνουν όσο το δυνατό πιο επίπεδα, ωστόσο τα κύτταρα εξακολουθούν να έχουν κάποιο πάχος. Η μία και μόνη λήψη ανά οπτικό πεδίο έχει ως αποτέλεσμα να μην φωτογραφίζονται όλες οι εστίες φθορισμού, δηλαδή εκείνες που βρίσκονται σε επίπεδο υψηλότερο ή χαμηλότερο από εκείνο για το οποίο είναι εστιασμένη η

φωτογραφία. Με αυτόν τον τρόπο χάνονται εστίες που δεν απεικονίζονται ή είναι ανεστίαστες, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να τις μετρήσει το λογισμικό. Έτσι γίνεται συστηματικά μια υποεκτίμηση του αριθμού των εστιών, αλλά το φαινόμενο είναι περισσότερο εμφανές στις μεγάλες δόσεις. Άλλο πρόβλημα που και πάλι οδηγεί στην υποεκτίμηση του αριθμού των εστιών στις μεγάλες δόσεις, όταν επιχειρείται απεικόνιση με μικροσκόπιο επιφθορισμού, είναι ότι καθώς αυξάνεται η δόση ακτινοβολίας, αυξάνεται και η πυκνότητα των εστιών και μαζί με την πυκνότητα αυξάνεται και η πιθανότητα δύο ή περισσότερες εστίες να βρίσκονται η μια κάτω από την άλλη, η πολύ κοντά. Το πρόβλημα της επικάλυψης των εστιών κατά την καταμέτρηση με το μάτι σε μεγάλο βαθμό ξεπερνιέται για τις εστίες που δεν συμπίπτουν επακριβώς, καθώς ο παρατηρητής έχει τη δυνατότητα να εστιάσει σε κάθε επίπεδο. Όμως η καταμέτρηση εστιών σε τόσο μεγάλες δόσεις είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία για τον ερευνητή.

#### **5.2.6 Ελαγωγή και επιδιόρθωση ΔΚΘ για διάφορες δόσεις σε καρκινικά κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα σε ακτίνες-X ή σε ιόντα Αργού**

Κύτταρα HepG2 ακτινοβολήθηκαν σε διαφορετικές περιόδους και μας εστάλησαν (μονιμοποιημένα) από τη συνεργάτιδά μας Christine Hellweg, με ακτίνες -X ή ιόντα Αργού. Οι εστίες φθορισμού εκτιμήθηκαν με το λογισμικό Jcount. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 5-12**. Για τις ακτίνες -X παρατηρούμε ότι στις 24 h, ακόμα και τα 2 Gy, έχουν επιδιορθωθεί και έχουν φτάσει τα επίπεδα υποβάθρου για το αντίστοιχο μη ακτινοβολημένο δείγμα των 24 h. Και ότι στις 6 h η επιδιόρθωση έχει προχωρήσει σημαντικά, με αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το μη ακτινοβολημένο δείγμα των 6 h.

Αντίθετα, για τα κύτταρα τα ακτινοβολημένα με ιόντα Αργού, η επιδιόρθωση ακόμα και στις 6 h δεν έχει προχωρήσει σημαντικά. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η αύξηση της LET οδήγησε σε δημιουργία περισσότερο σύνθετων βλαβών, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να δυσκολεύονται να τις επιδιορθώσουν. Επίσης ο αριθμός των εστιών είναι μικρότερος, αλλά αυτό συμβαίνει, γιατί όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5-4**, αλλά και στο **Γράφημα 5-2**, οι εστίες φθορισμού είναι μεγαλύτερες. Επομένως κρύβουν περισσότερες τις μιας ΔΚΘ η κάθε μια τους.



Γράφημα 5-12: Εξάρτηση του αριθμού των επαγόμενων εστιών γ-H2AX από τη δόση ακτινοβολίας και το χρόνο μετά την επιδιόρθωση για καρκινικά κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα (i) σε ακτίνες -γ ή (ii) σε ιόντα Αργού.

Στους Πίνακες 5-6 & 5-7 δίνονται τα αποτελέσματα για τα κύτταρα τα ακτινοβολημένα με ιόντα Αργού, θέτοντας διαφορετικές παραμέτρους στο λογισμικό. Τα αποτελέσματα που έχουν παριστώνται στο Γράφημα 5-12<sup>ii</sup>, προέρχονται από τον Πίνακα 5-6, όπου η επιλογή των παραμέτρων για την αναγνώριση των εστιών φθορισμού ήταν τέτοια ώστε να δίνει αυτό που πραγματικά βλέπαμε στην εικόνα.



Πίνακας 5-6: Αποτελέσματα για τα HepG2 κύτταρα ακτινοβολημένα με ιόντα Αργού, έχοντας θέσει στο λογισμικό Jcount παραμέτρους ώστε να καταμετρά μικρές εστίες φθορισμού.

μικρές εστίες γ-H2AX										
	0 Gy		0.1 Gy		0.5 Gy		1 Gy		2 Gy	
	avg foci N	stdev	avg	stdev	avg	stdev	avg	stdev	avg	stdev
	# >95%		# >95%		# >95%		# >95%		# >95%	
<b>0 h</b>	<b>0.41</b>	0.01	<b>0.87</b>	0.08	<b>2.24</b>	0.15	<b>5.11</b>	0.34	<b>12.14</b>	0.14
<b>1 h</b>	<b>0.41</b>	0.01	<b>0.45</b>	0.15	<b>2.78</b>	0.19	<b>4.20</b>	0.47	<b>11.37</b>	1.66
<b>6 h</b>	<b>0.42</b>	0.01	<b>0.36</b>	0.12	<b>2.08</b>	0.17	<b>3.63</b>	0.30	<b>10.96</b>	0.29
	0 Gy		0.1 Gy		0.5 Gy		1 Gy		2 Gy	
	avg foci N	stdev	avg	stdev	avg	stdev	avg	stdev	avg N	stdev
	total		total		total		total		total	
<b>0 h</b>	<b>1.19</b>	0.34	<b>1.21</b>	0.01	<b>2.45</b>	0.52	<b>5.88</b>	0.36	<b>12.21</b>	0.14
<b>1 h</b>	<b>0.55</b>	0.21	<b>0.50</b>	0.39	<b>3.10</b>	0.35	<b>4.49</b>	0.49	<b>12.25</b>	1.74
<b>6 h</b>	<b>0.83</b>	0.19	<b>0.40</b>	0.11	<b>2.24</b>	0.94	<b>4.07</b>	0.32	<b>10.94</b>	0.30

Πίνακας 5-7: Αποτελέσματα για τα HepG2 κύτταρα ακτινοβολημένα με ιόντα Αργού, έχοντας θέσει στο λογισμικό Jcount παραμέτρους ώστε να καταμετρά μεγάλες εστίες φθορισμόν, δηλαδή να ενώνει τις εστίες που βρίσκονται πολύ κοντά.

Μεγάλες εστίες γ-H2AX										
	0 Gy		0.1 Gy		0.5 Gy		1 Gy		2 Gy	
	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev
	# >95%		# >95%		# >95%		# >95%		# >95%	
<b>0 h</b>	<b>0.29</b>	0.12	<b>0.465</b>	0.08	<b>1.54</b>	0.25	<b>2.52</b>	0.11	<b>3.88</b>	0.31
<b>1 h</b>	<b>0.20</b>	0.29	<b>0.215</b>	0.08	<b>1.93</b>	0.26	<b>2.10</b>	0.32	<b>4.42</b>	0.35
<b>6 h</b>	<b>0.32</b>	0.34	<b>0.265</b>	0.18	<b>1.64</b>	0.70	<b>1.01</b>	0.01	<b>4.03</b>	0.42
	0 Gy		0.1 Gy		0.5 Gy		1 Gy		2 Gy	
	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev
	total		total		total		total		total	
<b>0 h</b>	<b>0.68</b>	0.13	<b>0.49</b>	0.09	<b>1.75</b>	0.26	<b>2.71</b>	0.11	<b>3.88</b>	0.31
<b>1 h</b>	<b>0.41</b>	0.31	<b>0.27</b>	0.08	<b>2.14</b>	0.27	<b>2.23</b>	0.33	<b>4.42</b>	0.35
<b>6 h</b>	<b>0.66</b>	0.36	<b>0.50</b>	0.19	<b>1.72</b>	0.74	<b>1.11</b>	0.01	<b>4.03</b>	0.42

Για τις μικρές εστίες  $\gamma$ -H2AX, δίνονται οι αριθμοί που προέκυψαν από το λογισμικό, αλλά δίνονται και οι τιμές, όπου έχουν κρατηθεί όσες τιμές εμπίπτουν σε διάστημα εμπιστοσύνης >95% γύρω από τη μέση τιμή, και πράγματι οι τιμές αυτές παρουσιάζουν μικρότερη τοπική απόκλιση.

Για τις ανάγκες της εκτίμησης του συνεντοπισμού με την πρωτεΐνη APE1, όπως αναφέρεται στα επόμενα, χρειάστηκε να ορίσουμε κάπως πιο μεγάλες εστίες, έτσι οι παράμετροι επιλέχτηκαν τέτοιες ώστε να ενοποιούν τις κοντινές εστίες. Τα αποτελέσματα αυτά, παρόλο που είναι δευτερεύοντα και αναφέρονται σε προκαταρκτικές προσπάθειες, παρουσιάζονται εδώ (**Πίνακας 5-7**), λόγω της σύμπτωσης που παρουσιάζουν με τον **Πίνακα 4-1**, όπου έχει γίνει θεωρητικός υπολογισμός των κρούσεων ανά κύτταρο, με το χρονικό σημείο της 1 h του **Πίνακα 5-7**.

Στην **Εικόνα 5-5** μεταξύ άλλων φαίνεται και η ανίχνευση των «μικρών» και «μεγάλων» εστιών της  $\gamma$ -H2AX που περιγράφονται στους **Πίνακες 5-6 & 5-7**.

### 5.2.7 Σύνοψη αποτελεσμάτων

5.2.1 Κατορθώσαμε να ανιχνεύσουμε τις ΔΚΘ στις πολύ χαμηλές δόσεις που εκθέτει τα κύτταρα ο οδοντιατρικός τομογράφος

5.2.2 Προσδιορίστηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο για ανίχνευση ΔΚΘ σε λεμφοκύτταρα, με δείκτη των ΔΚΘ τη  $\gamma$ -H2AX. Ο αριθμός ΔΚΘ προσδιορίστηκε στο  $7,6 \pm 0,9$  ΔΚΘ/(κύτταρο\*Gy). Μέχρι τα 2 Gy η ανίχνευση είναι εφικτή και η καμπύλη βγαίνει με καλή προσέγγιση ευθεία. Έγινε με επιτυχία η προσαρμογή καμπύλης για την έκφραση της χρονικής εξέλιξης των ΔΚΘ μέχρι το σημείο των 48 h μετά την έκθεση. Ο αριθμός των επαγόμενων εστιών αποκτά μέγιστο στη μία ώρα μετά την ακτινοβολήση, ενώ στις 24 h ο αριθμός τους επανέρχεται στις τιμές υποβάθρου (ενδογενών θραύσεων).

5.2.3 Εξετάζοντας συνολικά διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και εκθέσεις σε ακτινοβολίες διαφορετικής LET, βρέθηκε ότι η αύξηση της LET οδηγεί στη μείωση του αριθμού των ανιχνευόμενων εστιών φθορισμού και συνεκδοχικά (εάν ληφθεί υπόψη ότι το μέγεθος της κάθε εστίας μεγαλώνει, αυξανόμενης της LET) η πολυπλοκότητα των επαγόμενων βλαβών. Ενδεικτικές τιμές επαγόμενων εστιών που αντιπροσωπεύουν τις ΔΚΘ ανά Gy ακτινοβολίας και ανά κύτταρο:  $16,4 \pm 8,6$  για ακτίνες  $-\gamma$  (χαμηλή LET) και  $4,8 \pm 1,4$  για ιόντα Αργού (υψηλή LET).

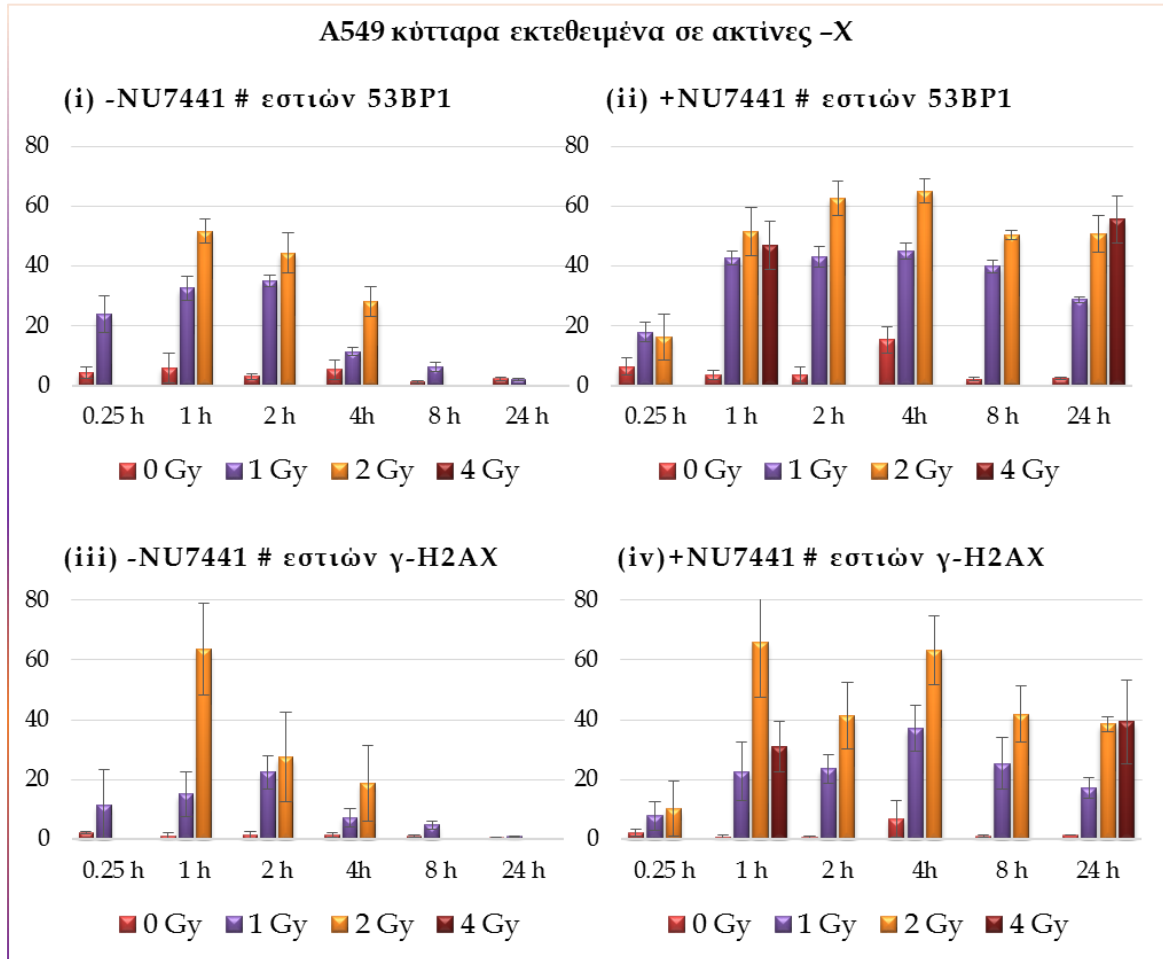
5.2.4 Εξετάζοντας τις διαφορές μεταξύ της έκθεσης κυττάρων A549 σε ακτίνες -X και σωμάτια -α προκύπτει για τη γ-H2AX ότι ο αριθμός επαγόμενων εστιών φθορισμού (ανά Gy και ανά κύτταρο) είναι  $30 \pm 6$  για τις ακτίνες -X και  $10 \pm 2$  για τα σωμάτια -α.

5.2.5 Για κύτταρα MCF7 εκτεθειμένα σε ακτίνες -γ βρέθηκε ότι ο αριθμός των εστιών γ-H2AX ανά κύτταρο και ανά Gy ακτινοβολίας είναι  $14,3 \pm 8,2$ .

5.2.6 Για κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα σε ακτίνες -X ή σε ιόντα Αργού, βρέθηκε ότι ο αριθμός των εστιών γ-H2AX ανά κύτταρο και ανά Gy ακτινοβολίας είναι  $13,3 \pm 4,1$  για τις ακτίνες -X και  $4,8 \pm 1,4$  για τα ιόντα Αργού.

### 5.3 Μελέτη ΔΚΘ υπό συνθήκες ανεπάρκειας / παρεμπόδισης επιδιορθωτικών μηχανισμών DNA

#### 5.3.1 Επαγωγή και επιδιόρθωση ΔΚΘ σε καρκινικά κύτταρα A549 εκτεθειμένα σε ακτίνες-X παρουσία του αναστολέα NU7441



Γράφημα 5-13: Αριθμός επαγόμενων εστιών 53BP1 (επάνω) και  $\gamma$ -H2AX (κάτω), σε καρκινικά κύτταρα A549 εκτεθειμένα σε ακτίνες -X απουσία (αριστερά) ή παρουσία (δεξιά) του αναστολέα NU7441.

Εξετάζεται εδώ η συμπεριφορά των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης των ΔΚΘ, ως προς την ικανότητά τους να δημιουργούν εστιές φθορισμού και κατ' επέκταση η επαγωγή και η επιδιόρθωση των ΔΚΘ καρκινικά κύτταρα A549 εκτεθειμένα σε ακτίνες -X, παρουσία ή μη, του αναστολέα της DNA-PK, NU7441. Οι αριθμοί των εστιών φθορισμού για την κάθε περίπτωση παρουσιάζονται στο **Γράφημα 5-13**, ενώ επιπλέον έχει υπολογιστεί και η επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων εκφρασμένη σε ποσοστό % των επιδιορθωμένων βλαβών ως προς τα αρχικά τους επίπεδα (**Πίνακας 5-8**). Το πρόσημο έχει κρατηθεί διότι έχει τη σημασία της αύξησης των βλαβών που μετρούνται στο τελικό χρονικό σημείο, ως

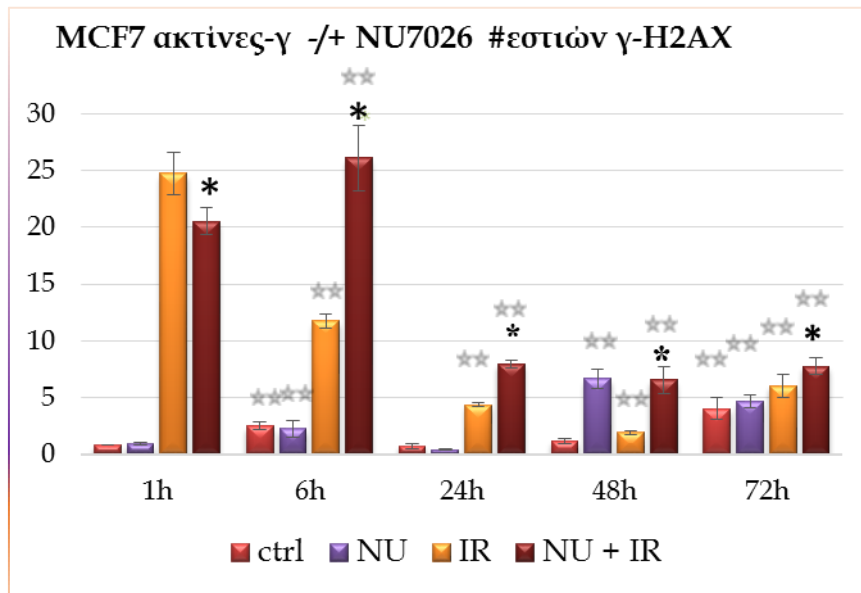
προς αυτές που μετρούνται στο αρχικό, στην περίπτωση που είναι αρνητικό. Ως αρχική τιμή έχουν ληφθεί οι μετρήσεις στη 1 h μετά την ακτινοβόληση.

Πίνακας 5-8: Επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων εκφρασμένη σε ποσοστό % των επιδιορθωμένων βλαβών ως προς τα αρχικά τους επίπεδα

συνθήκη	Χρόνος επιδιόρθωσης (h)	Δόση (Gy)	% Επιδ Ικανότητα [(αρχική βλάβη - τελική βλ.) / αρχική βλάβη*100%]
-NU7441 # εστιών 53BP1	24	0	~100
		1	94
+NU7441 # εστιών 53BP1	24	0	~100
		1	33
		2	1
		4	-21
-NU7441 # εστιών γ-H2AX	24	0	~100
		1	93
+NU7441 # εστιών γ-H2AX	24	0	~100
		1	25
		2	42
		4	-27

Από το **Γράφημα 5-13** και τον **Πίνακα 5-8**, είναι φανερή η επίπτωση στην επιδιόρθωση που προκάλεσε η παρουσία του αναστολέα της DNA-PK, NU7441. Η παρουσία του αναστολέα όχι μόνο έχει ως αποτέλεσμα τη μη επιδιόρθωση των βλαβών με το πέρας των ωρών, αλλά και τη μετατόπιση του μεγίστου, πέρα από την 1 h, που εμφανίζουν τα γραφήματα στα δεξιά. Σημειώνεται επίσης ότι τα μη ακτινοβολημένα δείγματα, όπου παρουσίαζαν παρόμοια επίπεδα, διορθώθηκαν «με το χέρι» να δείχνουν ~100, καθώς τυχαίες μικρές διακυμάνσεις, παρουσίαζαν μεγάλη «επιδιορθωτική ικανότητα», λόγω του ορισμού αυτής, χωρίς να έχει ιδιαίτερη βιολογική σημασία.

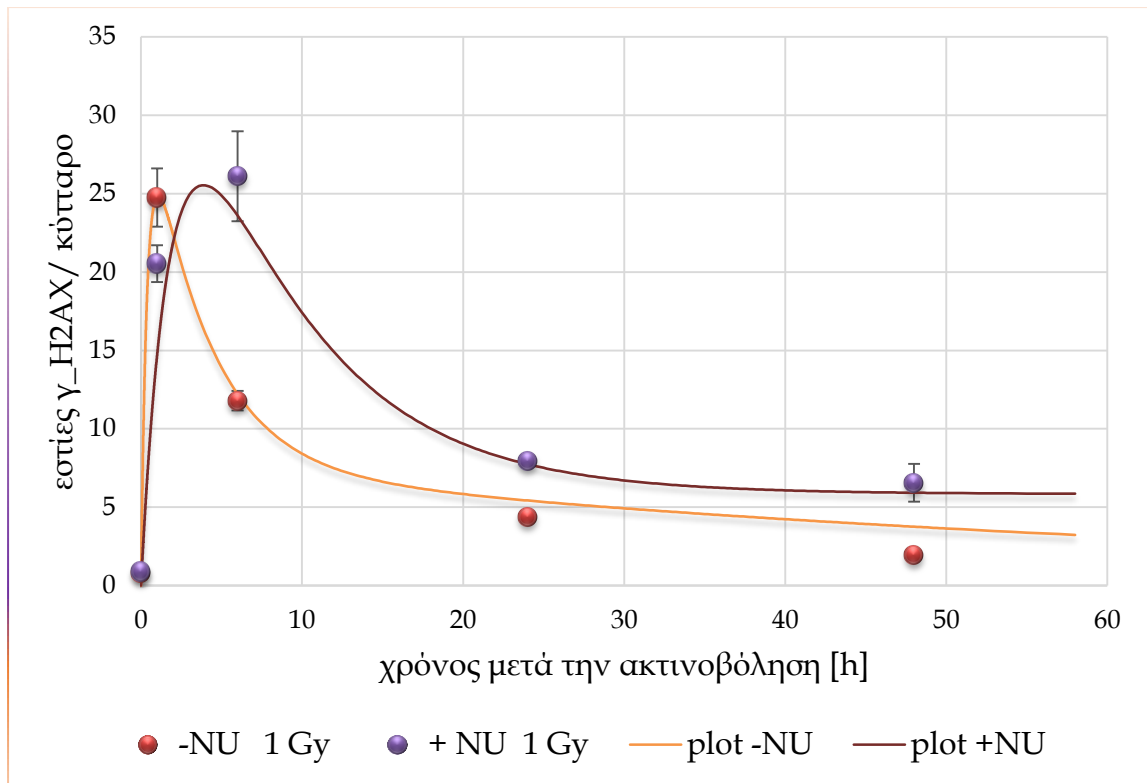
5.3.2 *Ελαγωγή και επιδιόρθωση ΔΚΘ σε καρκινικά κύτταρα MCF7, εκτεθειμένα σε ακτίνες-γ, παρουσία ή μη του αναστολέα επιδιόρθωσης NU7026*



Γράφημα 5-14 Αριθμός επαγόμενων εστιών γ-H2AX, σε καρκινικά κύτταρα MCF7 εκτεθειμένα σε ακτίνες-γ παρουσία ή μη του αναστολέα NU7026. Ο αστερίσκος '\*' δηλώνει στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το αντίστοιχο μη ακτινοβολημένο του ίδιου χρονικού σημείου, ενώ ο διπλός αστερίσκος '\*\*' δηλώνει στατιστικώς σημαντικές διαφορές για την κάθε συνθήκη σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα της 1 h.

Αρχικά παρατηρούμε ότι ο αναστολέας από μόνος του προκαλεί κάποια τοξικότητα από τις 48 h και μετά, οπότεν αρχίζουν να συσσωρεύονται βλάβες που προκαλούνται από τυχαία γεγονότα και όχι από την ακτινοβολήση (Γράφημα 5-14).

Συγκρίνοντας τα ακτινοβολημένα δείγματα χωρίς/με αναστολέα στη 1 και στις 6 h, το δείγμα χωρίς αναστολέα στις 6 h έχει προχωρήσει την επιδιόρθωσή του, ενώ το δείγμα με αναστολέα, ακόμα σχηματίζει εστίες επιδιόρθωσης δηλ. δίκλωνες θραύσεις. Στις 48 h το ακτινοβολημένο, χωρίς αναστολέα, έχει πλήρως επιδιορθώσει τις βλάβες του όπως αναμένεται, ενώ το δείγμα με αναστολέα καθυστερεί και σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου (μη ακτινοβολημένο, με αναστολέα, 48 h). Στις 72 h και τα 4 δείγματα εμφανίζουν αυξημένες εστίες σε σχέση με τα αντίστοιχά τους της 1 h. Όμως το δείγμα με τον αναστολέα εμφανίζει σε κάθε χρονική στιγμή αυξημένο αριθμό και σε σχέση με τα αντίστοιχα μη ακτινοβολημένα και σε σχέση φυσικά με τα αντίστοιχα μη ακτινοβολημένα και χωρίς αναστολέα.



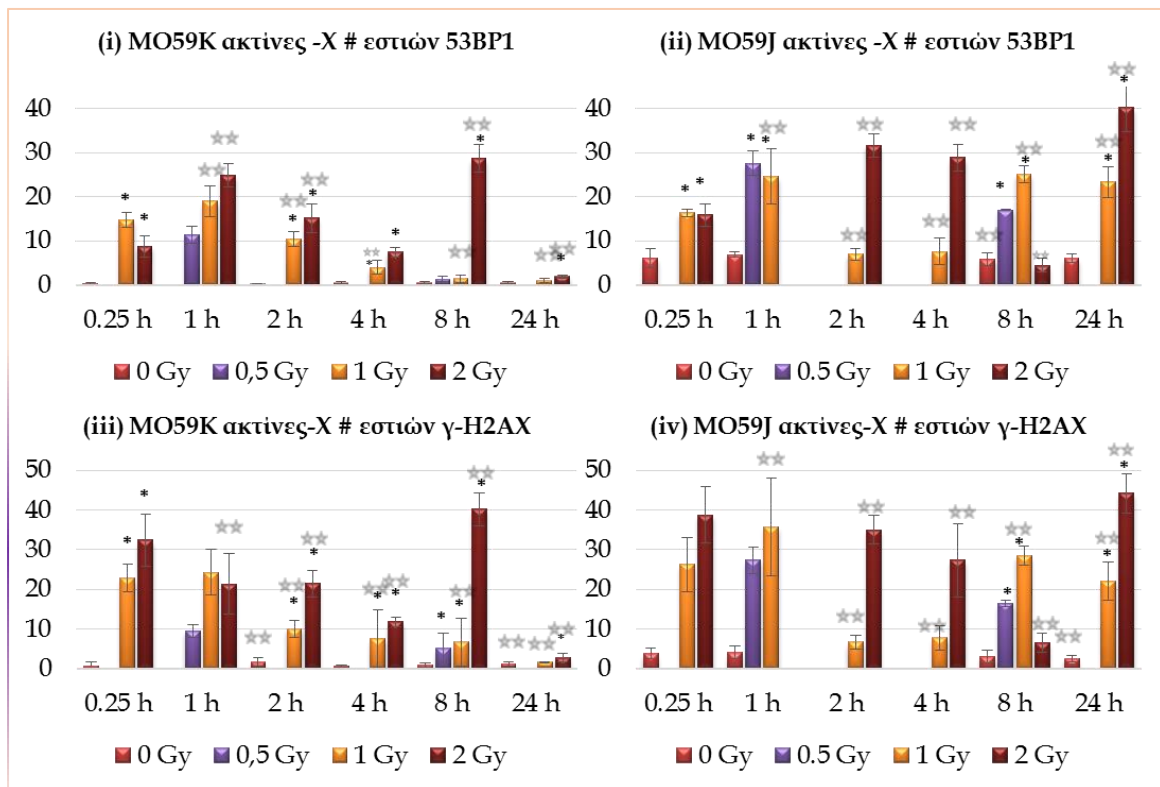
Γράφημα 5-15: Προσαρμογή καμπύλης στα δεδομένα για τη χρονική εξέλιξη των ακτινοβολημένων δειγμάτων, παρουσία ή μη του αναστολέα NU7026. Για τη χρονική στιγμή μηδέν έχουν ληφθεί υπόψη τα αντίστοιχα μη ακτινοβολημένα δείγματα.

Η καθυστέρηση στην εμφάνιση του μεγίστου, στην περίπτωση του αναστολέα φαίνεται και από την προσαρμογή καμπύλης στα δεδομένα που απεικονίζεται στο **Γράφημα 5-15**. Στον **Πίνακα 5-9** παρουσιάζεται η επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων εκφρασμένη σε ποσοστό % των επιδιορθωμένων κυττάρων σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα των βλαβών. Εδώ ως αρχικά επίπεδα έχουν ληφθεί υπόψη τα πειραματικά δεδομένα για τη 1h μετά την ακτινοβολήση.

Πίνακας 5-9 Επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων εκφρασμένη σε ποσοστό % των επιδιορθωμένων βλαβών ως προς τα αρχικά τους επίπεδα.

συνθήκη	Χρόνος επιδιόρθωσης (h)	Δόση (Gy)	% Επιδ Ικανότητα [(αρχική βλάβη - τελική βλ.) / αρχική βλάβη * 100%]
-NU7026 # εστιών γ-H2AX	24	0	~100
		1	82
	48	0	2
		1	92
	72	0	3
		1	76
+NU7026 # εστιών γ-H2AX	24	0	~100
		1	61
	48	0	~100
		1	68
	72	0	~100
		1	62

### 5.3.3 Ελαγωγή και επιδιόρθωση ΔΚΘ σε καρκινικά κύτταρα MO59K και MO59J



Γράφημα 5-16: Αριθμός επαγόμενων εστιών 53BP1 (επάνω) και γ-H2AX (κάτω), σε εκτεθειμένα σε ακτίνες -X καρκινικά κύτταρα MO59K (αριστερά) ή MO59J (δεξιά). καρκινικά κύτταρα MCF7 εκτεθειμένα σε ακτίνες-γ παρουσία ή μη του αναστολέα NU7026. Ο αστερίσκος '\*' δηλώνει στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το αντίστοιχο μη ακτινοβολημένο του ίδιου χρονικού σημείου, ενώ ο διπλός αστερίσκος '\*\*' δηλώνει στατιστικώς σημαντικές διαφορές για την κάθε συνθήκη σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα των 0,25 h.

Στο πείραμα που παρουσιάζεται σε αυτήν την παράγραφο εξετάζεται η συμπεριφορά των εστιών φθορισμού που δημιουργούνται από τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των ΔΚΘ, 53BP1 και γ-H2AX μεταξύ των κυτταρικών σειρών MO59K και MO59J. Τα κύτταρα MO59J υστερούν παντελώς στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της DNA-PK, DNA-PKcs, για αυτόν το λόγο είναι κατά πολύ λιγότερο ικανά στην επιδιόρθωση του DNA σε αντίθεση με τα ισογονιδιακά τους τα MO59K, λόγω μιας μετάλλαξης μετατόπισης πλαισίου. Σε αυτή την περίπτωση περιμένουμε τον NHEJ να υπολειπεται σημαντικά και έτσι παρατηρούμε μία συσσώρευση δίκλωνων θραύσεων.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 5-16** και στον **Πίνακα 5-10** παρουσιάζεται η επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων εκφρασμένη σε ποσοστό % των επιδιορθωμένων κυττάρων σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα των βλαβών. Ως αρχικά επίπεδα έχουν ληφθεί υπόψη τα πειραματικά δεδομένα για τη 1 h μετά την ακτινοβολήση.



Πίνακας 5-10: Επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων εκφρασμένη σε ποσοστό % των επιδιορθωμένων βλαβών ως προς τα αρχικά τους επίπεδα.

συνθήκη	Χρόνος επιδιόρθωσης (h)	Δόση (Gy)	% Επιδ Ικανότητα [(αρχική βλάβη - τελική βλ.) / αρχική βλάβη*100%]
MO59K # εστιών 53BP1	8	0	~0
		0,5	87
		1	95
		2	92
MO59J # εστιών 53BP1	8	0	~0
		0,5	39
		1	15
MO59K # εστιών γ-H2AX	24	0	~0
		0,5	49
		1	93
		2	88
MO59J # εστιών γ-H2AX	24	0	~0
		0,5	40
		1	30

#### 5.3.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων

5.3.1 Μελετήθηκε η επίπτωση στην επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων A549, που είχαν εκτεθεί σε ακτίνες -Χ, του αναστολέα της DNA-PK NU7441. Παρατηρήθηκε ισχυρή παρεμπόδιση της επιδιόρθωσης όπου εάν εκφραστεί σε αριθμούς ανιχνευόμενων εστιών των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης ((αρχικός αριθμός εστιών -τελικός αριθμός εστιών)/αρχικό αριθμό εστιών)\*100 έχουμε τα εξής αποτελέσματα για το 1 Gy: Για τις εστιές της γ-H2AX η επιδιορθωτική ικανότητα από το 93% (χωρίς αναστολέα) πέφτει στο 25 % (με αναστολέα) και για τις εστιές της 53BP1 οι αντίστοιχες τιμές είναι 94% (χωρίς αναστολέα) και 33 % (με αναστολέα).

5.3.2 Μελετήθηκε η επίπτωση στην επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων MCF7 , που είχαν εκτεθεί σε ακτίνες -γ, του αναστολέα επιδιόρθωσης NU7024 (DNA-PK) για τα χρονικά σημεία των 24 h, 48h και 72 h μετά την ακτινοβολήση. Για αυτά τα χρονικά σημεία τα αντίστοιχα αποτελέσματα απουσία ή παρουσία του αναστολέα ήταν: 82% → 31% (24 h), 92% → 68% (48 h) και 76% → 62% (72 h). Παρατηρούμε ότι η ποσοστιαία μείωση της επιδιορθωτικής ικανότητας είναι μικρότερη από αυτήν που εκδηλώνεται παρουσία του αναστολέα NU7441, καθώς και ότι και χωρίς τον αναστολέα παρουσιάζουν μικρότερη επιδιορθωτική ικανότητα από τα κύτταρα A549. Τα MCF7 φέρουν ενδογενώς μειωμένη επιδιορθωτική ικανότητα για τις ΔΚΘ. Μάλιστα η επίδραση του αναστολέα, κρίνοντας από το τελευταίο χρονικό σημείο, φαίνεται πως εξαλείφεται με την πάροδο του χρόνου, δηλαδή τελικώς τα κύτταρα σε κάποιο βαθμό καταφέρνουν να επιτύχουν κάποια επίπεδα επιδιόρθωσης.

5.3.3 Συγκρίθηκαν δύο καρκινικές σειρές η MO69K με την MO59J, όπου η δεύτερη υστερεί στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της DNA-PK (DNA-PKcs). Για το 1 Gy ακτινοβολίας και τις 24 h επιδιόρθωσης, η μεταξύ τους διαφορά στην επιδιορθωτική ικανότητα ήταν 93% για τα MO59K και 30 % για τα MO59J.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τις εστίες  $\gamma$ -H2AX μεταξύ των τριών πινάκων αυτής της ενότητας από τους Πίνακες 5-8, 5-9 & 5-10, για τις 24 h και το 1 Gy ακτινοβολίας προέκυψε ο Πίνακας 5-11.

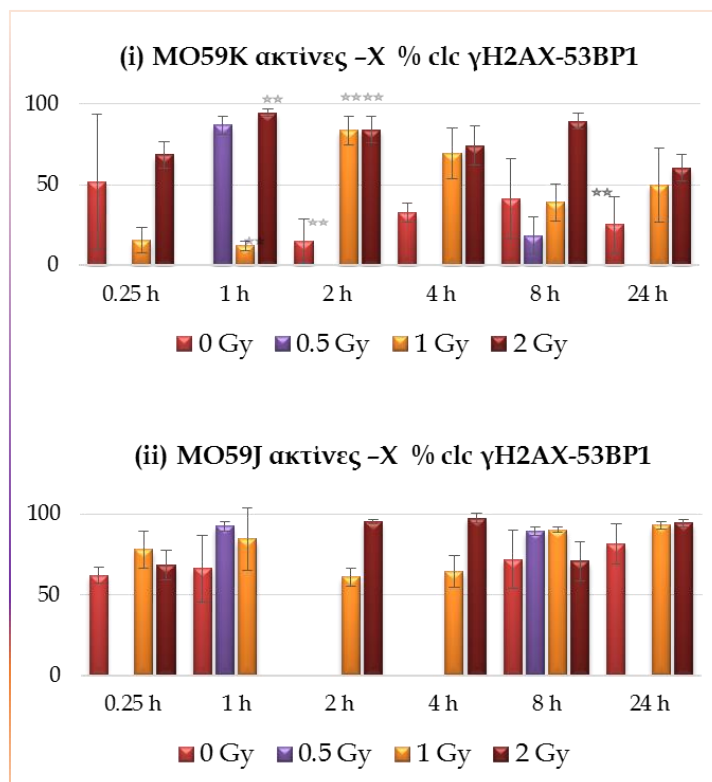
*Πίνακας 5-11 Σύγκριση της επιδιορθωτικής ικανότητας βασισμένη στις εστίες  $\gamma$ -H2AX για διάφορες συνθήκες παρεμπόδισης της επιδιόρθωσης*

Πίνακας 5-8	-NU7441 A549	93%
	+NU7441 A549	25%
Πίνακας 5-9	-NU7026 MCF7	82%
	+NU7026 MCF7	61%
Πίνακας 5-10	MO59K	93%
	MO59J	30%

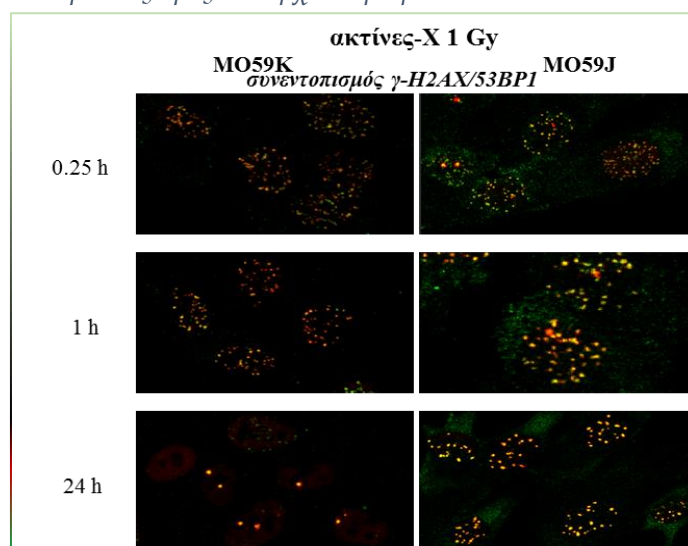
Αν και τα αποτελέσματα δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα, καθώς πρόκειται για διαφορετικές κυτταρικές σειρές, προκύπτει ότι ο αναστολέας NU7026 φαίνεται να επηρεάζει λιγότερο τα κύτταρα από τον αναστολέα NU7441. Θα περίμενε κανείς τα κύτταρα που ενδογενώς υστερούν στην DNA-PK να έχουν τη χειρότερη συμπεριφορά, και όμως τη χειρότερη την έχουν τα κύτταρα με τον αναστολέα NU7441, καθώς είναι λιγότερο επιλεκτικός (στην αναστολή του) από τον NU7026, προκαλεί περισσότερη ζημιά στα κύτταρα [130].

## 5.4 Μελέτες συνεντοπισμού και σύνθετες βλάβες DNA

### 5.4.1 Σύγκριση συνεντοπισμού μεταξύ των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης των ΔΚΘ, σε καρκινικά κύτταρα MO59K και MO59J, εκτεθειμένα σε ακτίνες-γ



Γράφημα 5-17: Μελέτη συνεντοπισμού με την κλασική μέθοδο, μετρούμενη σε ποσοστά % συμβάντων συνεντοπισμού ως προς τον αρχικό αριθμό εστιών.



Εικόνα 5-4: Εικόνες από το συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου έχει γίνει η προβολή μέγιστης έντασης στον άξονα z. Με 1 Gy ακτίνων-X έχουν ακτινοβοληθεί κύτταρα MO59K (αριστερά) και MO59J (δεξιά). Ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης ΔΚΘ γ-H2AX (πράσινο) και 53BP1 (κόκκινο). Από τις εικόνες γίνεται φανερό ότι ο συνεντοπισμός είναι πολύ μεγάλος.

## 5.4.2 Μελέτη συνεντοπισμού μεταξύ ΔΚΘ και της APE1, σε καρκινικά κύτταρα HerG2, εκτεθειμένα σε ακτίνες-γ ή σε ιόντα Αργού

### 5.4.2.1 Πρώιμα αποτελέσματα

Παρατίθενται εδώ για λόγους πληρότητας και καταγραφής της προόδου που επιτεύχθη τις προσπάθειες για την εκτίμηση του συνεντοπισμού μεταξύ των πρωτεϊνών APE1 και γ-H2AX για τα κύτταρα HerG2 εκτεθειμένα σε ιόντα Αργού. Οι πρώτες προσπάθειες αφορούσαν σε απόπειρες καταμέτρησης των επιπέδων της πρωτεΐνης APE1 στο πρότυπο των εστιών φθορισμού, με το λογισμικό Jcount. Το πρόβλημα που προέκυπτε κάθε φορά ήταν η μεγάλη ευαισθησία του εξαγόμενου αριθμού εστιών APE1 στις μικρές μεταβολές των παραμέτρων του λογισμικού. Επομένως δε μπορούσε να γίνει η απευθείας σύγκριση μεταξύ των συνθηκών (χρόνος / δόση), καθώς δε μπορούσαμε να εμπιστευτούμε τις τιμές αυτές ως απόλυτη αποτύπωση του αριθμού των εστιών και κατ' επέκταση των επιπέδων της πρωτεΐνης APE1 και των επιπέδων των βλαβών βάσης.

Πίνακας 5-12: Πρώτες προσπάθειες ανίχνευσης συνεντοπισμού. Αριθμός εστιών APE1 ανά κύτταρο και ανά επιφάνεια κυττάρου.

APE1 per cell										
	0 Gy		0.1 Gy		0.5 Gy		1 Gy		2 Gy	
	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev	avg foci N	stdev
	total		total		total		total		total	
<b>0 h</b>	<b>175.8</b>	0.1	<b>187</b>	9	<b>164</b>	34	<b>242</b>	12	<b>194</b>	26
<b>1 h</b>	<b>180</b>	17	<b>191</b>	26	<b>203</b>	40	<b>279</b>	3	<b>147</b>	9
<b>6 h</b>	<b>197</b>	14	<b>192</b>	3	<b>191</b>	53	<b>196</b>	9	<b>165</b>	1

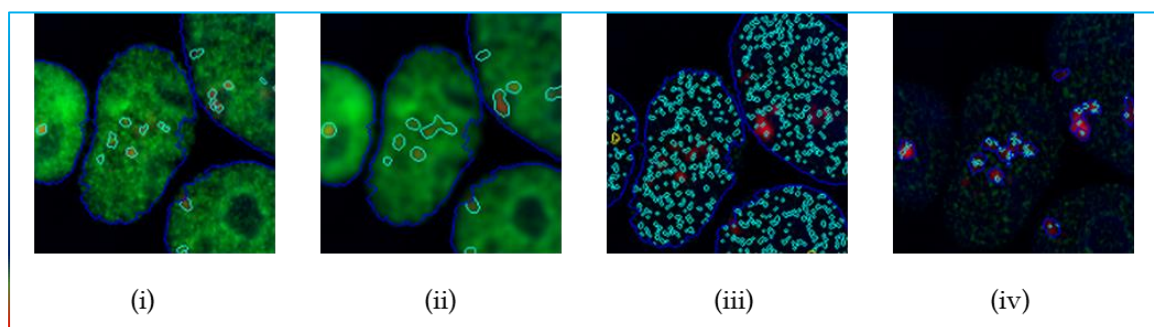
  

APE1 foci number per cell area										
<b>0 h</b>	<b>0.021</b>	0.001	<b>0.022</b>	0.001	<b>0.021</b>	0.003	<b>0.022</b>	0.004	<b>0.0214</b>	0.0009
<b>1 h</b>	<b>0.021</b>	0.000	<b>0.024</b>	0.002	<b>0.023</b>	0.000	<b>0.031</b>	0.0026	<b>0.0200</b>	0.0001
<b>6 h</b>	<b>0.021</b>	0.001	<b>0.023</b>	0.001	<b>0.021</b>	0.004	<b>0.021</b>	0.001	<b>0.0194</b>	0.0002
parameters	th6 20,8 2.20.5 80									

Για έναν επιπλέον έλεγχο, προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε αν υπήρχε κάποια διαφορά στην πυκνότητα των εστιών ως προς την επιφάνεια του κυττάρου (μεταξύ των συνθηκών δόσης ή χρόνου). Αυτός ο λόγος (αριθμός ανά επιφάνεια) θα μας εξασφάλιζε την εξάλειψη της όποιας εσφαλμένης επίδρασης θα μπορούσε να συνεισφέρει η διαφορά στο μέγεθος των κυττάρων. Ο αριθμός αυτός προέκυπτε κάθε φορά για κάθε κύτταρο.

Περαιτέρω έγινε προσπάθεια και πάλι στα πλαίσια της θεώρησης ότι η πρωτεΐνη APE1 σχηματίζει όντως εστίες φθορισμού, να καταμετρηθούν αυτές οι εστίες επάνω στις εστίες της δίκλωνης θραύσης, και να γίνει έτσι η σύγκριση.

Για το σκοπό αυτό, μετρήσαμε τις εστίες των ΔΚΘ, δηλαδή τις εστίες της  $\gamma$ -H2AX, με δύο διαφορετικά σετ παραμέτρων. Το πρώτο σετ, μας έδινε τα αποτελέσματα επιλογής των εστιών  $\gamma$ -H2AX, συνεπή με τη φωτογραφία (**Πίνακας 5-6**). Αυτές τις εστίες τις αποκαλέσαμε «μικρές εστίες  $\gamma$ -H2AX» για να τις διαχωρίσουμε από τις άλλες εστίες, που τις ονομάσαμε «μεγάλες εστίες  $\gamma$ -H2AX». Πάνω στις μεγάλες εστίες θελήσαμε να μετρήσουμε τις κατά πολύ μικρότερες εστίες της APE1. Αυτό προέκυψε πάλι από την ανάγκη να βγάλουμε συνεπή αποτελέσματα, καθώς το μικρό εμβαδό των κανονικών-μικρών εστιών  $\gamma$ -H2AX, δεν επαρκούσε ώστε το λογισμικό να κάνει «αμερόληπτο» κατακερματισμό (fragmentation) και να διαχωρίσει μικρότερες εστίες της APE1.



*Εικόνα 5-5 Ανίχνευση αντικειμένων στο λογισμικό Jcount, ανάλογα με τις παραμέτρους που θέτει ο χρήστης. (i) επιλογή εστιών  $\gamma$ -H2AX, στο κανονικό τους μέγεθος, για καταμέτρηση του αριθμού τους, ανά κύτταρο. (ii) Επιλογή εστιών  $\gamma$ -H2AX, μεγαλύτερου μεγέθους, οι οποίες θα αποτελέσουν τα αντικείμενα για να γίνει η ανίχνευση των εστιών APE1 στο 'iv'. (iii) Επιλογή εστιών APE1 και καταμέτρησή τους ανά κύτταρο. (iv) επιλογή εστιών APE1 και καταμέτρησή τους ανά μεγάλη εστία  $\gamma$ -H2AX.*

Στην **Εικόνα 5-5** αποτυπώνονται οι διάφορες θεωρήσεις των αντικειμένων που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω ανάλυση.

Τελικώς η ανίχνευση του φαινομένου γινόταν συγκρίνοντας τον αριθμό των μικρών εστιών APE1 ανά επιφάνεια μεγάλης εστίας  $\gamma$ -H2AX (**Πίνακας 5-13**), με τον αριθμό των εστιών APE1 ανά επιφάνεια κυττάρου, **Πίνακες 5-12**. Η θεώρηση αυτή ήταν απαραίτητη για να γίνει διάκριση μεταξύ του τυχαίου και του αληθινού συνεντοπισμού.

Πίνακας 5-13: Πρώτες προσπάθειες ανίχνευσης συνεντοπισμού. Ο αριθμός εστιών APE1 ανά μεγάλη εστία γ-H2AX και ανά επιφάνεια μεγάλης εστίας γ-H2AX.

APE1 per large γH2AX focus										
	0 Gy		0.1 Gy		0.5 Gy		1 Gy		2 Gy	
	avg foci	stdev	avg foci	stdev	avg foci	stdev	avg foci	stdev	avg foci	stdev
	N		N		N		N		N	
	total		total		total		total		total	
<b>0 h</b>	<b>1.41</b>	0.21	<b>2.65</b>	0.10	<b>3.32</b>	0.45	<b>3.47</b>	0.17	<b>2.67</b>	0.08
<b>1 h</b>	<b>1.31</b>	0.16	<b>3.42</b>	0.85	<b>3.57</b>	0.01	<b>3.73</b>	0.02	<b>2.56</b>	0.25
<b>6 h</b>	<b>1.51</b>	0.31	<b>2.53</b>	1.00	<b>3.09</b>	0.13	<b>2.96</b>	0.06	<b>2.98</b>	0.11

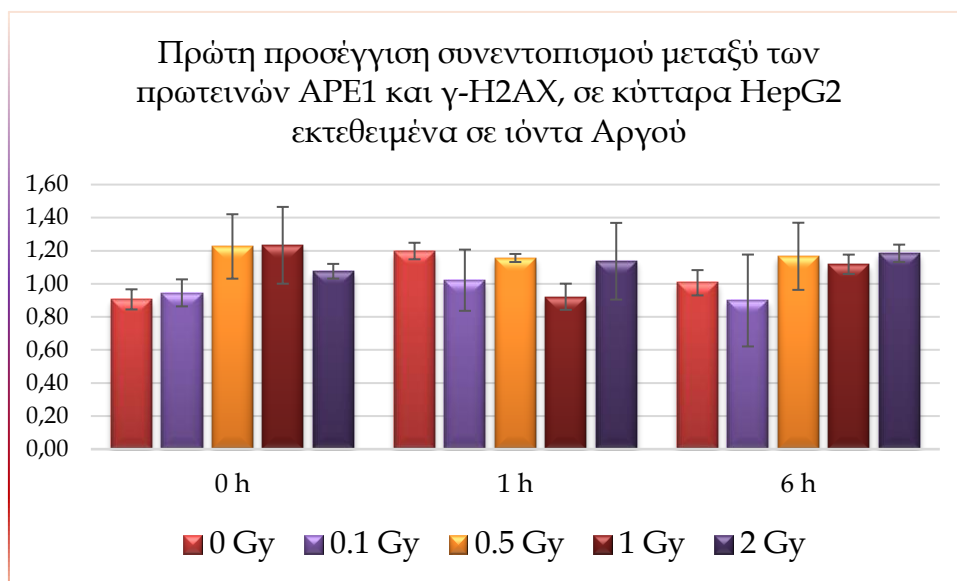
APE1 foci number per large γH2AX focus area										
<b>0 h</b>	<b>0.019</b>	0.001	<b>0.021</b>	0.001	<b>0.026</b>	0.002	<b>0.027</b>	0.002	<b>0.0231</b>	0.000
<b>1 h</b>	<b>0.025</b>	0.001	<b>0.024</b>	0.004	<b>0.027</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.0228</b>	0.005
<b>6 h</b>	<b>0.021</b>	0.001	<b>0.020</b>	0.006	<b>0.025</b>	0.001	<b>0.024</b>	0.001	<b>0.0230</b>	0.001

Από μόνη της η καταμέτρηση των εστιών APE1 πάνω στις εστίες της γ-H2AX δε μπορεί να δώσει αξιόπιστο αποτέλεσμα, όταν η χρώση που παρουσιάζει η APE1 είναι διάσπαρτη σε όλον τον πυρήνα (Εικόνα 5-6). Έτσι η σύγκριση των λόγων της επιφανειακής πυκνότητας κρίθηκε ως περισσότερο αξιόπιστο μέτρο για την ανίχνευση και τη διερεύνηση του φαινομένου.

Στο **Γράφημα 5-18** παρουσιάζονται οι λόγοι των ποσοτήτων που αναφέρονται στους **Πίνακες 5-12 & 5-13**. Τα σφάλματα υπολογίστηκαν από τη σχέση για τη διάδοση σφάλματος [131].

$$\delta f = \frac{\bar{u}}{\bar{v}} \sqrt{\left(\frac{\delta u}{\bar{u}}\right)^2 + \left(\frac{\delta v}{\bar{v}}\right)^2}, \quad \text{όπου } f = \frac{u}{v}$$

Η προσέγγιση και τα σχετικά αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί [4] και διαφέρουν σχετικά από τις επόμενες δύο ιδέες που διατυπώσαμε στο ότι στον παρονομαστή του κλάσματος λαμβάνει όλη την επιφάνεια του πυρήνα. Στις επόμενες δύο παραμέτρους που ορίσαμε, στο  $F_{like}$  και  $P_{clc}$  στον παρονομαστή του κλάσματος, τα μεγέθη θεωρούνται όχι πλέον σε σχέση με ολόκληρο τον πυρήνα, αλλά σε σχέση με το υπόλοιπο του πυρήνα, εάν αφαιρεθούν οι μεγάλες εστίες φθορισμού **Σχήμα 4-6Γ**.

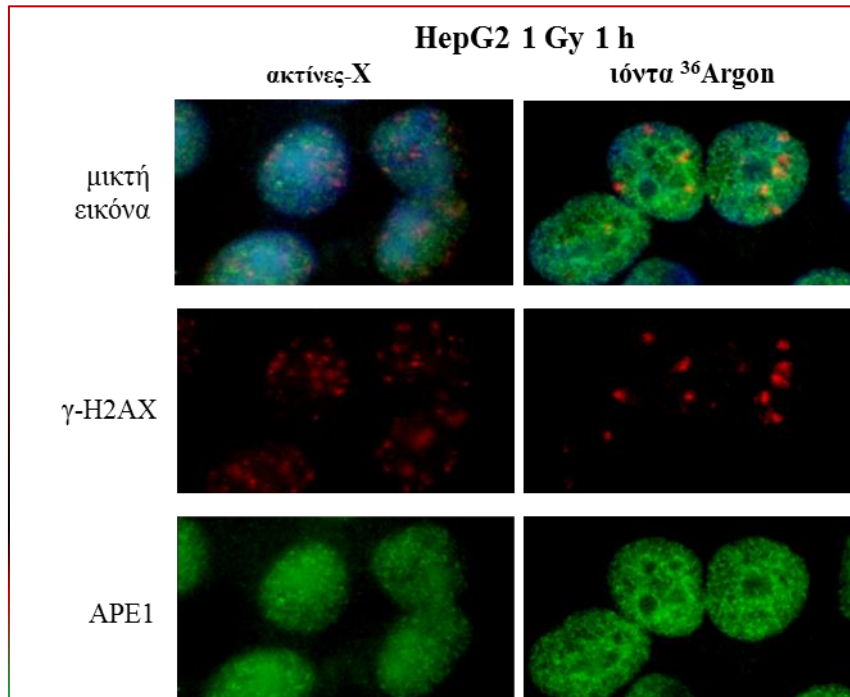


Γράφημα 5-18: Κύτταρα HepG2 ακτινοβολημένα με ιόντα Αργού. Παρουσιάζεται για κάθε πειραματικό σημείο το κλάσμα των λόγων (αριθμός εστιών APE1 ανά επιφάνεια μεγάλης εστίας  $\gamma$ -H2AX διὰ τον αριθμό εστιών APE1 ανά επιφάνεια πυρήνα του κυττάρου). Από αυτήν την προσέγγιση αναμένεται η όποια ανίχνευση αληθινού συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών να εμφανίζει κλάσμα μεγαλύτερο της μονάδας.

#### 5.4.2.2 Τελική προσέγγιση για την εκτίμηση του συνεντοπισμού

Θέλοντας να ισχυροποιήσουμε το κριτήριο ύπαρξης ή μη συνεντοπισμού μεταξύ δύο πρωτεϊνών που παρουσιάζουν διαφορετικό μέγεθος οι εστίες τους, και ειδικά σε περιπτώσεις όπως αυτή στο παρόν πείραμα, όπου η πρωτεΐνη APE1, καθώς έχει ενδογενή συγκέντρωση παρουσιάζει εκτεταμένη χρώση, ορίσαμε την παράμετρο  $P_{clc}$ . Η παράμετρος αυτή συγκρίνει τη μέση ένταση του πράσινου χρώματος, πάνω στις κόκκινες εστίες, με τη μέση ένταση του πράσινου χρώματος πάνω στον υπόλοιπο πυρήνα, δηλαδή στον όγκο που ορίζει ο πυρήνας του κυττάρου εάν αφαιρεθούν οι κόκκινες μεγάλες εστίες. Για την ακρίβεια, για κάθε κύτταρο, στον αριθμητή νοείται ο μέσος όρος (μεταξύ των κόκκινων εστιών που έχει το κύτταρο) των μέσων εντάσεων στο πράσινο χρώμα. Τα χρώματα φυσικά, εδώ δίνονται για να είναι παραστατική η περιγραφή. Κόκκινο έχουμε ονομάσει τις μεγάλες εστίες που σχηματίζουν οι δείκτες που ανιχνεύουν τις δίκλωνες θραύσεις, και πράσινο το δείκτη για την ανίχνευση βλαβών βάσης. Σημειώνεται εδώ ότι αυτή η θεώρηση ξεπερνάει την όποια αβεβαιότητα στην επιλογή των εστιών APE1, από το λογισμικό. Επίσης το ότι εκφράζεται η παράμετρος  $P_{clc}$ , ως κλάσμα με αριθμητή και παρονομαστή και

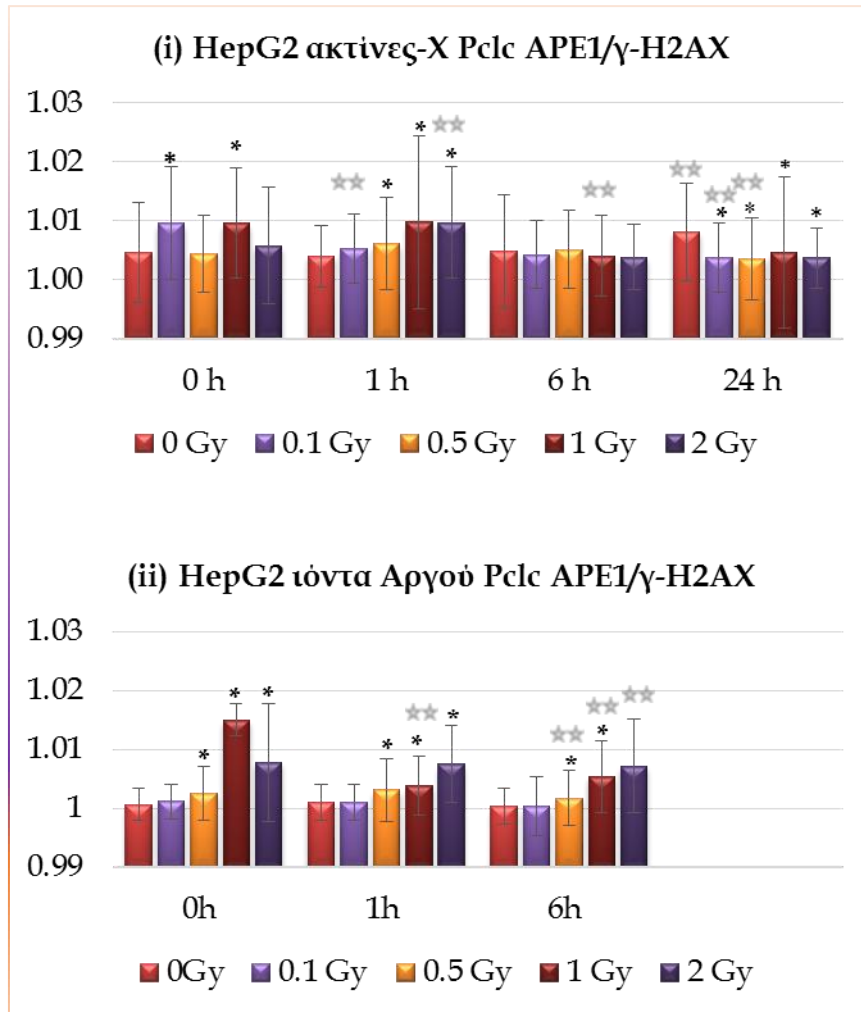
λαμβάνεται ανά κύτταρο και όχι ανά εικόνα, ξεπερνιόνται έτσι τα τυχαία σφάλματα που θα υπεισέρχονταν στην ανάλυση από τυχαίες διακυμάνσεις της φωτεινότητας, ή των συνθηκών απεικόνισης.



Εικόνα 5-6: Εικόνες από το μικροσκόπιο επιφθορισμού για τα καρκινικά κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα σε ακτίνες-X (αριστερά) ή σε ιόντα Αργού (δεξιά), στη 1 h μετά την ακτινοβολήση. Διακρίνονται στη δεύτερη γραμμή οι εστίες φθορισμού που σχηματίζει η  $\gamma$ -H2AX να είναι μεγαλύτερες και λιγότερες στην περίπτωση της έκθεσης σε ιόντα Αργού. Η εμφανιζόμενη χρώση στο APE1 είναι διάχυτη, καθώς αφενός το ένζυμο αυτό εμφανίζει ενδογενή συγκέντρωση στα κύτταρα και αφετέρου διότι το πρωτόκολλο χρώσης που ακολουθήθηκε σε αυτά τα πειράματα δεν ήταν το βέλτιστο δυνατό.

Στο **Γράφημα 5-19** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που εξήχθησαν για αυτά τα πειράματα σύμφωνα με την παράμετρο  $P_{dcr}$  που ορίστηκε από εμάς.





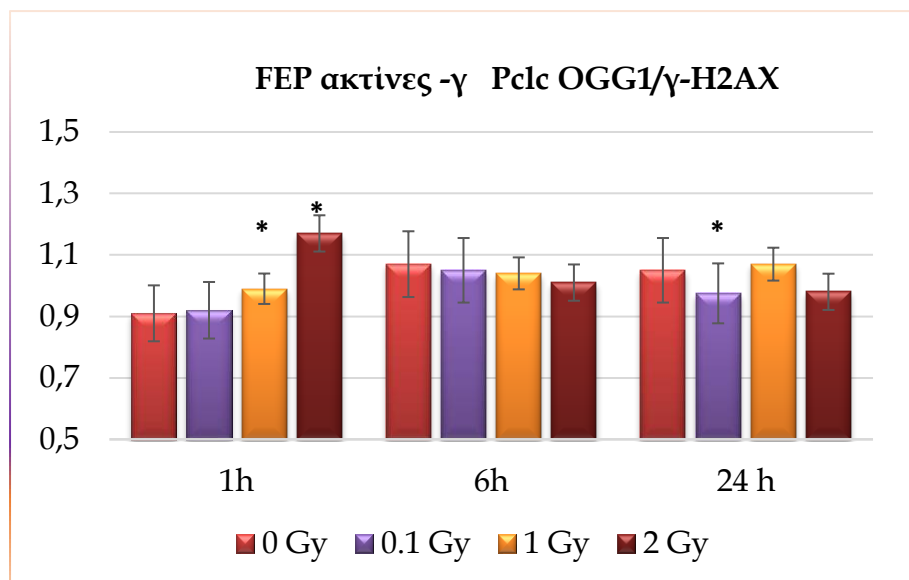
Γράφημα 5-19: Μελέτη συνεντοπισμού μεταξύ των πρωτεϊνών APE1 και  $\gamma$ -H2AX, σύμφωνα με την παράμετρο Pclc, για καρκινικά κύτταρα HepG2 εκτεθειμένα (i) σε ακτίνες -X ή (ii) σε ιόντα Αργού. Ο αστερίσκος '\*' καταδεικνύει στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τα 0 Gy, του αντίστοιχου χρονικού σημείου, ενώ τα δύο αστέρια '\*\*' σημειώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές για την κάθε δόση, μεταξύ του χρονικού σημείου που εξετάζεται σε σχέση με τις 0 h. Υπενθυμίζεται ότι για την παράμετρο Pclc, όπως ορίζεται, τιμές μικρότερες της μονάδας δείχνουν «αρνητικό» συνεντοπισμό, τιμές γύρω στη μονάδα δείχνουν τυχαίο, χωρίς βιολογική σημασία συνεντοπισμό, ενώ τιμές μεγαλύτερες της μονάδας δίνουν τον «αληθινό» συνεντοπισμό.

Αυστηρά κρίνοντας τα γραφήματα, ειδικά το (i), θα λέγαμε ότι κυμαίνεται στα όρια του τυχαίου συνεντοπισμού. Όμως το γράφημα (ii) είναι περισσότερο πειστικό. Παρατηρείται στο πρώτο χρονικό σημείο για το 1 και τα 2 Gy σημαντική διαφορά, σε σχέση με το μη ακτινοβολημένο. Ακόμα περισσότερο αυτή η διαφορά στα επόμενα χρονικά σημεία, ελαττώνεται, αποκαλύπτοντας ίσως έτσι τη δημιουργία σύνθετης βλάβης η οποία επιδιορθώθηκε με την πάροδο του χρόνου. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να τονιστεί ότι το φαινόμενο που προσπαθούμε να ανιχνεύσουμε, είναι πολύ λεπτό, και δύσκολα ανιχνεύσιμο. Η ανάλυση τέτοιων εικόνων με τόσο διάχυτη και πλεονάζουσα χρώση, είναι

εξαιρετικά δύσκολη, αλλά για αυτόν ακριβώς το λόγο ορίσαμε αυτό το κριτήριο, την παράμετρο  $P_{clc}$ , η οποία καλείται να αποκαλύψει τις όποιες διαφορές μεταξύ των συνθηκών.

Στις επόμενες παραγράφους γίνεται συζήτηση για το πώς θα μπορούσαμε για τη δεδομένη φύση της πρωτεΐνης, που παρουσιάζει ενδογενή συγκέντρωση στα κύτταρα, να γίνει καλύτερη οπτικοποίηση.

#### 5.4.3 Μελέτη συνεντοπισμού μεταξύ ΔΚΘ και της OGG1 σε καρκινικά κύτταρα FEP18-11-T1, εκτεθειμένα σε ακτίνες-γ



Γράφημα 5-20: Μελέτη συνεντοπισμού μεταξύ των πρωτεϊνών OGG1 και  $\gamma$ -H2AX, σύμφωνα με την παράμετρο  $P_{clc}$ , για καρκινικά κύτταρα FEP18-11-T1 εκτεθειμένα σε ακτίνες  $\gamma$ . Ο αστερίσκος '\*' καταδεικνύει στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τα 0 Gy, του αντίστοιχου χρονικού σημείου. Υπενθυμίζεται ότι για την παράμετρο  $P_{clc}$ , όπως ορίζεται, τιμές μικρότερες της μονάδας δείχνουν «αρνητικό» συνεντοπισμό, τιμές γύρω στη μονάδα δείχνουν τυχαίο, χωρίς βιολογική σημασία συνεντοπισμό, ενώ τιμές μεγαλύτερες της μονάδας δίνουν τον «αληθινό» συνεντοπισμό.

Στο πείραμα αυτό, όπου κερατινοκύτταρα έχουν ακτινοβοληθεί με ακτίνες  $\gamma$ , οριακά ανιχνεύτηκε ο συνεντοπισμός για τη δόση των 2 Gy, στο χρονικό σημείο της 1 h. Η χρώση στο κανάλι απεικόνισης της OGG1 (πράσινο) ήταν διάχυτη, σχηματίζοντας κάποιες

μορφές που ομοιάζουν με εστίες. Καθώς όμως ο στατιστικός έλεγχος έβγαλε πολύ μικρό  $p$  ( $1.21 \times 10^{-13}$ ) όταν έγινε η σύγκριση με τα 0 Gy του ίδιου χρόνου, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι όντως ανιχνεύσαμε αληθινό συνεντοπισμό. Σημειώνεται επίσης ότι για κάθε πειραματικό σημείο, γινόταν στατιστικός έλεγχος μεταξύ αριθμητή και παρονομαστή, (το συγκεκριμένο είχε  $p=1.2 \times 10^{-5}$ ) του κλάσματος που αποτελεί την παράμετρο  $P_{clc}$ . Ο δεύτερος αυτός στατιστικός έλεγχος του οποίου τα αποτελέσματα δίνονται αναλυτικά για οικονομία λόγου, έχει το νόημα του να καταδείξει το κατά πόσον ο αριθμητής είναι όντως μεγαλύτερος από τον παρονομαστή. Ο έλεγχος αυτός έγινε ανά ζεύγη μέσα στο ίδιο φυσικά δείγμα.

Συμπερασματικά, παρατηρήσαμε για την περίπτωση ακτινοβόλησης φυσιολογικών κερακινοκυττάρων με ακτίνες  $\gamma$  ότι οι σύνθετες βλάβες εντοπίζονται μέχρι και το χρονικό σημείο της 1 h, ενώ στη συνέχεια φαίνεται πως στις 6 h και εξής οι βλάβες βάσεων έχουν επιδιορθωθεί. Στις 24 h και οι Δίκλωνες Θραύσεις έχουν επιδιορθωθεί. Το γράφημα της χρονικής εξέλιξης των δίκλωνων θραύσεων παρατίθεται στο **Παράρτημα**.

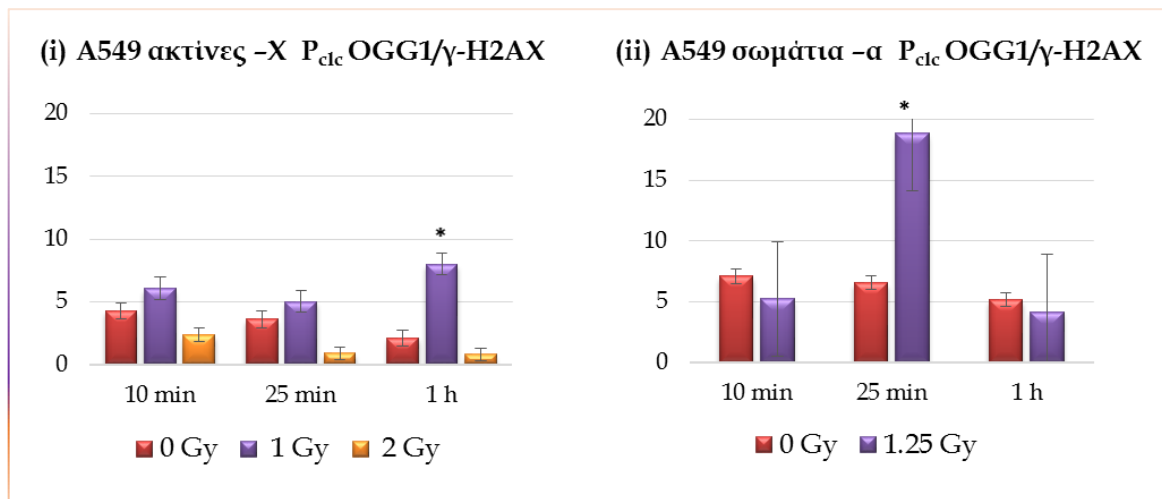
#### **5.4.4 Μελέτη συνεντοπισμού μεταξύ ΔΚΘ και βλαβών βάσεων σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες-X ή σε σωμάτια-α**

Για την ανίχνευση του συνεντοπισμού μεταξύ πρωτεϊνών που επιδιορθώνουν τις ΔΚΘ ( $\gamma$ -H2AX ή 53BP1) και πρωτεϊνών που επιδιορθώνουν βλάβες βάσεων (APE1 ή OGG1), κατά την επίσκεψη της γράφουσας στο εργαστήριο του καθηγητή Ηλιάκη, στο Essen, εκτελέστηκαν σε συνεργασία με τον ερευνητή Emil Mladenov σειρά από πειράματα.

Δοκιμάσαμε στο πρωτόκολλο του εργαστηρίου (δίδεται στο παράρτημα ως "Emil's protocol") σε συνδυασμό με τις αραιώσεις και τους χρόνους επώασης που προτείνει ο ερευνητής Asaithamby στη δημοσίευσή του [132] στο περιοδικό PNAS. Το συγκεκριμένο πείραμα έδωσε μεγάλο σήμα υποβάθρου.

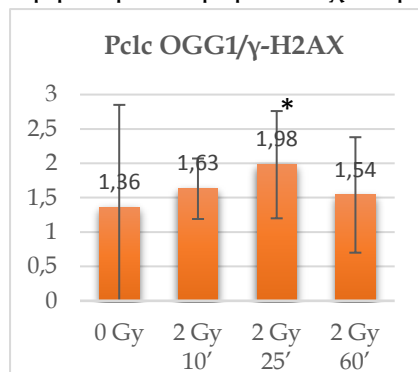
Στη συνέχεια, δοκιμάσαμε επακριβώς το πρωτόκολλο του ερευνητή Asaithamby [132], αφού σε προγενέστερο χρόνο είχαμε έρθει σε επαφή μαζί του και μας το είχε παραχωρήσει. Αυτή τη φορά δοκιμάσαμε να ακτινοβολήσουμε εκτός με ακτίνες  $\gamma$  και με σωμάτια  $\alpha$ . Ο λόγος που ακτινοβολήσαμε με σωμάτια  $\alpha$  ήταν γιατί τα σωμάτια  $\alpha$  έχουν μεγαλύτερη LET από τις ακτίνες  $\gamma$ . Επομένως περιμένουμε να εμφανίσουν ομαδοποιημένες βλάβες

σε μεγαλύτερο βαθμό. Και πάλι το πείραμα αυτό είχε σχετικό υψηλό σήμα υποβάθρου, το αναλύσαμε διεξοδικά και τα αποτελέσματα για τα σωμάτια -α ήταν ικανοποιητικά σχετικά με την ανίχνευση συνεντοπισμού, υπό τη μορφή εστιών φθορισμού και στα δύο αντισώματα (OGG1 για τις οξειδωμένες γουανίνες και  $\gamma$ -H2AX για τις δίκλωνες θραύσεις), για το χρονικό σημείο των 25 min (Εικόνα VI-6 δεξιά στήλη). Όπως φαίνεται και στο Γράφημα VI-21, η παράμετρος  $P_{clc}$  παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση για αυτό το πειραματικό σημείο.



Γράφημα 5-21: Μελέτη συνεντοπισμού των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης OGG1 και  $\gamma$ -H2AX, για την ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες -X ή σε σωμάτια -α. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται σύμφωνα με την παράμετρο  $P_{clc}$ .

Κατόπιν εκτελέσαμε ένα μεγάλο πείραμα σε συνολικά 20 καλυπτρίδες, δοκιμάζοντας 5 διαφορετικά πρωτόκολλα για μία δόση ακτινοβολίας (2 Gy) και τρία χρονικά σημεία (10, 20 και 60 min). Δοκιμάσαμε τους συνδυασμούς αντισωμάτων ( $\gamma$ -H2AX & OGG1: ΔΚΘ και οξειδωμένες γουανίνες) και (53BP1 & APE1: ΔΚΘ και αβασικά σημεία). Το σημαντικό που εισήχθη σε αυτό το πείραμα ήταν το στάδιο της προ-εξαγωγής (pre-extraction). Δηλαδή της διαπερατοποίησης της πυρηνικής μεμβράνης και την έκλυση των πυρήνων πρινημονιμοποίηση. Η τεχνική αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και απαιτεί πολύ λεπτούς



Γράφημα 5-22

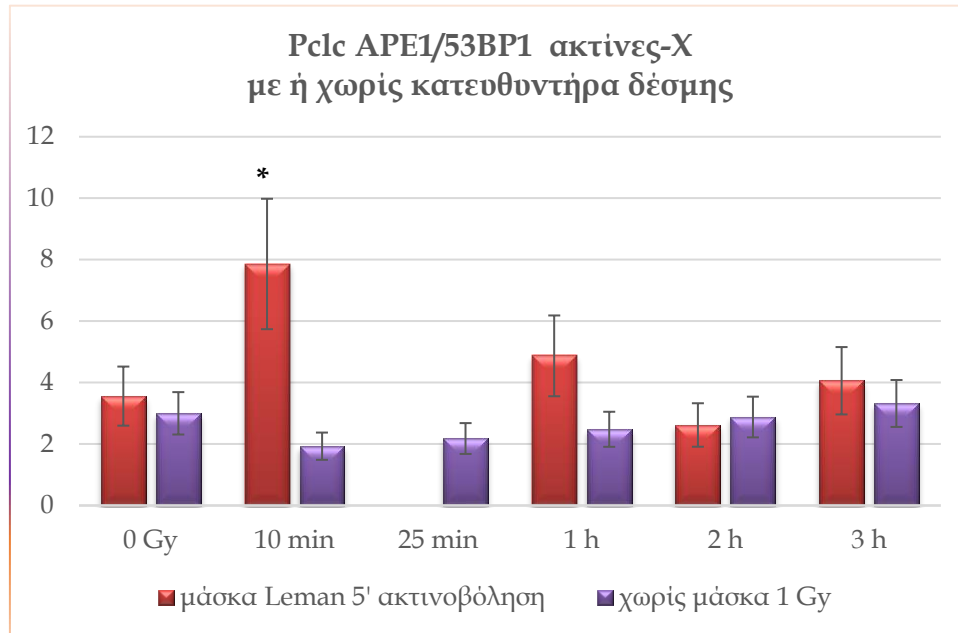
χειρισμούς, όπως το να γίνεται πάνω σε πάγο, οι χρόνοι να είναι αυστηρά καθορισμένοι και να είναι οι όποιες μετακινήσεις των τρυβλίων οι ελάχιστες δυνατές. Τούτα απαιτούνται διότι τα κύτταρα που δεν έχουν ακόμα μονιμοποιηθεί είναι εξαιρετικά ευάλωτα σε μικροαλλαγές πρωτοκόλλου. Η προεξαγωγή φιλοδοξεί να απομακρύνει τις πρωτεΐνες εκείνες που δεν είναι

προσδεμένες σε άλλες, δηλαδή που δε συμμετέχουν στην επιδιόρθωση. Δηλαδή ενδιαφερόμαστε να απομακρύνουμε τα μόρια της μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης που είναι ελεύθερα στον πυρήνα και στα οποία δεν ασκούνται ηλεκτρικές δυνάμεις που τα συγκρατούν στη γειτονιά της βλάβης. Η διαδικασία αυτή ήταν ιδέα του έμπειρου ερευνητή Emil Mladenov και από αυτό το σημείο και εξής έγινε μία στροφή στην αντίληψη του εργαστηρίου μας, χρησιμοποιήθηκε και στο εργαστήριό μας για το πώς να οπτικοποιηθούν αυτά τα δύσκολα φαινόμενα. Το διάλυμα προεξαγωγής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.2% triton-X σε PBS για 5 min, σε πάγο. Και αυτό το πείραμα αναλύθηκε διεξοδικά, αλλά δεν παρουσιάζεται καθώς τα αποτελέσματά του δε συνεισφέρουν κάτι ουσιαστικό στη συζήτηση. Παρά τα μεγάλα σφάλματα και πάλι παρατηρούμε οριακά να συμβαίνει κάτι στα 25 min μετά την ακτινοβολία (**Γράφημα 5-22**).

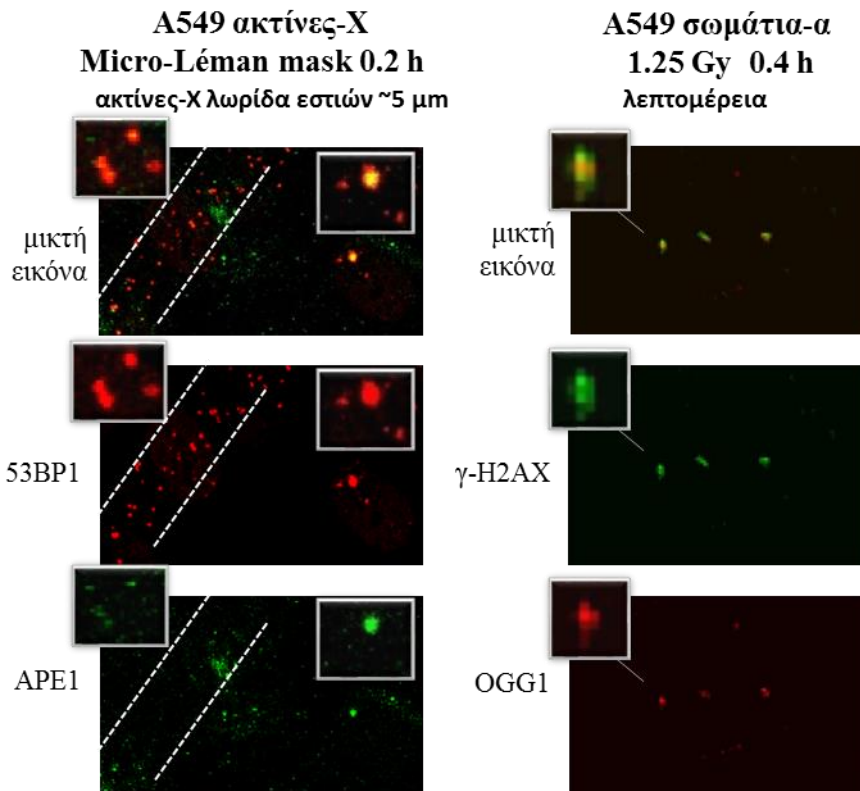
#### **5.4.5 Μελέτη συνεντοπισμού μεταξύ ΔΚΘ και βλαβών βάσεων σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες-X με ή χωρίς κατευθυντήρα θέσμης**

Στη συνέχεια, θέλοντας και πάλι να εντοπίσουμε τις βλάβες σε κάποια γειτονιά του κυττάρου, επιχειρήσαμε μία ακτινοβολία με ακτίνες -X, όπου μεταξύ της δέσμης και των κυττάρων παρεμβάλλονταν μία μεταλλική μάσκα με παράλληλες χαραγές, της τάξης των 2 μm πλάτους. Η ιδέα για αυτό το πείραμα ήταν η μερική έκθεση του κάθε κυττάρου στην ακτινοβολία, ώστε αφού μέχρι στιγμής είχε αποδειχθεί τόσο δύσκολη η οπτικοποίηση του συνεντοπισμού στο πρότυπο των εστιών φθορισμού, τουλάχιστον να βλέπαμε αυτή τη διάχυτη χρώση, έστω να σχηματίζει λωρίδες. Δηλαδή την επαγωγή μιας ανομοιογένειας στη χρώση του κάθε κυττάρου. Καταφέραμε να οπτικοποιήσουμε με σαφήνεια, για ένα πειραματικό σημείο, το φαινόμενο. Και αυτό συνέβη για το χρονικό σημείο των 10 min μετά την έκθεση. Δυστυχώς η καλυπτρίδα που αποτελούσε το επόμενο πειραματικό σημείο, των 25 min, κατά τη διαδικασία της χρώσης έσπασε, κι έτσι χάθηκε το σημείο που θα περιμέναμε το φαινόμενο να παρουσιάζει μέγιστο.

Στο ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές για προεξαγωγή με το ίδιο διάλυμα, αλλά για διάρκεια 10 min. Όπως επίσης και προεξαγωγή με το διάλυμα csk (10 mM HEPES-KOH pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM Sucrose, 1 mM EGTA pH 8.0, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % Triton-X). Και οι δύο αυτές επιπλέον συνθήκες αποδείχτηκαν πολύ ισχυρές, και σχεδόν καταστροφικές για την εικόνα, με ισχυρότερη τη διαδικασία με το διάλυμα csk.



Γράφημα 5-23 Μελέτη συνεντοπισμού των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης APE1 και 53BP1, για την ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες -Χ με ή χωρίς τον κατευθυντήρα δέσμης Micro-Leman. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται σύμφωνα με την παράμετρο  $P_{clc}$ .



Εικόνα 5-7: Εικόνες συνεντοπισμού μεταξύ πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης και των πρωτεϊνών των ΔΚΘ. Αριστερά) κύτταρα A549 εκτεθειμένα σε ακτίνες -X παρουσία του κατευθυντήρα δέσμης Micro-Léman συνεντοπισμός μεταξύ της APE1 και της 53BP1. Δεξιά) A549 κύτταρα εκτεθειμένα σε σωματία -α, συνεντοπισμός μεταξύ της OGG1 και της γ-H2AX.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα , συμπεραίνουμε ότι ανιχνεύθηκε συνεντοπισμός για σύνθετες βλάβες DNA ύστερα από έκθεση σε λωρίδες ακτίνων X που μπορεί να πει κανείς ότι προσομοιάζουν σε ένα βαθμό την πορεία ενός σωματίου.

#### 5.4.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων

5.4.2 Ανιχνεύτηκαν τιμές συνεντοπισμού για τα ιόντα Αργού, οι οποίες λόγω του ότι παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά, καταδεικνύουν την ύπαρξη συνεντοπισμού. Η τιμή οριακά βρέθηκε πάνω από το 1, όμως δε μπορεί να αξιολογηθεί ταυτόχρονα με τα αποτελέσματα που ακολούθησαν, καθώς στα επόμενα υπήρξε σημαντική βελτίωση της πειραματικής διαδικασίας. Επανάληψη του πειράματος σύμφωνα με τα νεότερα ευρήματα θα δώσει αντιπροσωπευτική τιμή στην παράμετρο  $P_{clc}$ , για την έκθεση σε ακτινοβολίες υψηλής LET.

5.4.3 Σε φυσιολογικά κερατινοκύτταρα, εκτεθειμένα σε ακτίνες  $\gamma$ , ανιχνεύτηκε συνεντοπισμός μεταξύ της πρωτεΐνης OGG1 του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης (οξειδωμένες γουανίνες) και της  $\gamma$ -H2AX που ανιχνεύει δίκλωνες θραύσεις, μετρούμενος με την παράμετρο Pclc. Συγκεκριμένα για το χρονικό σημείο της μιας ώρας και για τα 2 Gy βρέθηκε  $Pclc=1.17 \pm 0.12$  (ενώ για τα 0 Gy η αντίστοιχη τιμή ήταν  $0,91 \pm 0,23$ ).

5.4.4 Μελετήθηκε ο συνεντοπισμός μεταξύ των πρωτεϊνών OGG1 και  $\gamma$ -H2AX σε καρκινικά κύτταρα A549 εκτεθειμένα σε ακτίνες  $\alpha$  ή σε σωματίδια  $\alpha$ . Αξιοσημείωτη αύξηση παρουσίασε η περίπτωση των σωματιών  $\alpha$  όπου στα 25 min μετά την ακτινοβολήση βρέθηκε  $Pclc=18 \pm 4$  ενώ η αντίστοιχη τιμή για τις ακτίνες  $\alpha$  βρέθηκε  $5 \pm 1$ . Η σταδιακή βελτίωση του πρωτοκόλλου φέρνει καλύτερα αποτελέσματα στις μετρούμενες τιμές

5.4.5 Η προσθήκη του κατευθυντήρα δέσμης σε συνδυασμό με τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ανοσοφθορισμού ανέδειξε το συνεντοπισμό μεταξύ 53BP1 (για τις ΔΚΘ) και της APE1 (για τα αβασικά σημεία) μέσω της παραμέτρου Pclc η οποία βρέθηκε  $8 \pm 2$  για το ακτινοβολημένο δείγμα για το χρονικό σημείο των 10 min ενώ η αντίστοιχη τιμή για το μη ακτινοβολημένο ήταν  $4 \pm 1$ .



# ΜΕΡΟΣ Γ' – ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ

## ΑΝΑΛΥΣΗ

### 6 ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Οι αναστολείς επιδιόρθωσης είναι μικρά μόρια τα οποία επιδρούν στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης με στόχο να ανακόψουν τη λειτουργία τους, παρακωλύοντας τη διαδικασία της επιδιόρθωσης. Πολλές θεραπείες του καρκίνου στοχεύουν στο DNA των καρκινικών κυττάρων, αναγκάζοντάς τα να περάσουν σε απόπτωση. Τα καρκινικά κύτταρα όμως, επιστρατεύοντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, τείνουν να επιδιορθώνονται, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η έρευνα για τον εντοπισμό νέων και αποτελεσματικών αναστολέων στοχεύει στη συνδυαστική χρήση τους με Ακτινοθεραπεία ή με Χημειοθεραπεία. Στο μέρος αυτό παρουσιάζεται μια βιβλιογραφική επισκόπηση των αναστολέων που ήδη χρησιμοποιούνται κλινικά ή βρίσκονται στη στάδιο των κλινικών δοκιμών. Με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής προσδιορίζονται οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης που ενέχονται σε δύο ή περισσότερους μηχανισμούς ώστε να προταθούν ως στόχοι νέων αναστολέων με σκοπό τη «σύνθετη θνητότητα» (synthetic lethality). Όσα παρουσιάζονται στην παράγραφο αυτή έχουν δημοσιευτεί σε μορφή [7].

Οι προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας που ασχολείται στη μάχη ενάντια στον καρκίνο ολοένα προσανατολίζεται σε πιο εξειδικευμένες τεχνικές. Το κλειδί και ταυτόχρονα η μεγάλη πρόκληση για τη θεραπεία του καρκίνου είναι η επίτευξη της μέγιστης δυνατής επιλεκτικότητας στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων έναντι των υγιών. Ενδεικτικά, οι ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, τις οποίες αξιοποιούν οι θεραπείες για τον καρκίνο, είναι: αδυναμίες στην επιδιόρθωση του DNA όπως μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1/BRCA2 στον καρκίνο του μαστού ή/και των ωοθηκών, η απώλεια ελέγχου κυτταρικού κύκλου και ο υψηλός αναδιπλασιασμός, υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες και βλαβών στο DNA καθώς και χρωμοσωματική αστάθεια.

#### 6.1 Αναστολείς επιδιόρθωσης ανά μηχανισμό

Ακολουθεί η επισκόπηση των αναστολέων επιδιόρθωσης που βρίσκονται αυτή τη στιγμή στο στάδιο της κλινικής δοκιμής. Ταξινομούνται στο παρόν κείμενο σύμφωνα με τον

επιδιορθωτικό μηχανισμού του DNA στον οποίο ανήκει η πρωτεΐνη στην οποία έkaστος στοχεύει.

### **6.1.1 Αναστολείς του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης**

Η πρωτεΐνη από το Μηχανισμό Εκτομής Βάσης που έχει μελετηθεί περισσότερο για τον εντοπισμό αναστολέων είναι η PARP. Πολλές είναι οι κλινικές δοκιμές που αφορούν αυτήν την πρωτεΐνη και πλήθος φαρμακευτικών αναστολέων έχουν αναπτυχθεί. Ωστόσο έχουν γίνει και κάποιες προσπάθειες για την ανάπτυξη αναστολέων έναντι της APE1.

Ίσως ο αναστολέας ο περισσότερο μελετημένος από τους αναστολείς της PARP<sup>22</sup> είναι ο ABT-888, γνωστός και ως Veliparib. Ο ABT-888 γαντζώνεται στο θύλακα νικοτιναμίδης της πρωτεΐνης PARP. Χορηγείται σε συνδυασμό με το temozolomide (**Πίνακας 6-1, # 1 & 2**) ή το cyclophosphamide (**Πίνακας 6-1, # 3 & 4**). Τα temozolomide και cyclophosphamide είναι φάρμακα χημειοθεραπείας, αλκυλιωτικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις βάσεις Γουανίνης [133, 134]. Ο ABT-888 μπορεί επίσης να συνδυαστεί με το topotecan ή το gemcitabine (**Πίνακας 6-1, # 5 & 6**). Το gemcitabine προκαλεί απόπτωση, ενώ το topotecan είναι επίσης αναστολέας, ένας αναστολέας τοποϊσομεράσης. Στη Χημειοθεραπεία, συχνά χρησιμοποιούνται ουσίες, τα λεγόμενα προφάρμακα, οι οποίες μετατρέπονται σε ενεργά φάρμακα, μετά την είσοδό τους στον οργανισμό. Τα προφάρμακα εκδηλώνουν την επιθυμητή δράση τους μετά από ενζυματικό ή/και χημικό μετασχηματισμό.

Ένας τέτοιος αναστολέας είναι η καπεσιταβίνη (capecitabine), μια μη-κυτταροτοξική καρβαμιδική φθοριοπουριμιδίνη, η οποία λειτουργεί σαν ένας από στόματος χορηγούμενος πρόδρομος της κυτταροτοξικής 5-φθοριουρακίλης (5-FU). Ο μεταβολίτης της καπεσιταβίνης ουσιαστικά παρεμποδίζει την αντίδραση μεθυλίωσης του δεοξουριδυλικού οξέος σε θυμιδυλικό οξύ, επηρεάζοντας έτσι περαιτέρω τη σύνθεση του DNA, ενώ οδηγεί επίσης σε αναστολή σύνθεσης του RNA και κατά συνέπεια της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Η χρήση τέτοιου είδους πρόδρομων φαρμάκων μοιάζει πολλά υποσχόμενη. Σε μια τρέχουσα κλινική δοκιμή Φάσης I ελέγχονται αυξανόμενες δόσεις του veliparib, ενός αναστολέα της PARP, σε συνδυασμό με την καπεσιταβίνη και ακτινοβολίες, σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του ορθού (**Πίνακας 6-1, # 7**).

---

<sup>22</sup> **PARP:** Poly (ADP-ribose) polymerase: ανθρώπινη πολυμεράση της πολυ-άδενο διφωσφορικής ριβόζης: οικογένεια πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, μεταξύ των οποίων η επιδιορθωση του DNA και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Ένας άλλος πολύ συχνά χρησιμοποιούμενος αναστολέας της PARP είναι η ολαπαρίμπη (olaparib/ AZD2281/ KU005868) [135]. Η ολαπαρίμπη αναστέλλει τη δράση της ανθρώπινης πολυμεράσης της πολυ-άδενο διφωφορικής ριβόζης (PARP), η οποία συμβάλλει στην επιδιόρθωση του DNA των κυττάρων που έχει υποστεί βλάβη (τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα) κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχει εναλλακτικός μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA, ο οποίος απαιτεί την ύπαρξη των πρωτεϊνών BRCA1 και BRCA2. Ο εν λόγω εναλλακτικός μηχανισμός δεν λειτουργεί ορθά στα καρκινικά κύτταρα με μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 ή BRCA2. Ως εκ τούτου, όταν αναστέλλεται η δράση του ενζύμου PARP, το DNA που έχει υποστεί βλάβη στα καρκινικά κύτταρα δεν μπορεί να επιδιορθωθεί και συνεπώς, τα καρκινικά κύτταρα νεκρώνονται. Η ολαπαρίμπη αντιδρά με το δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης-αδενίνης στην οξειδωμένη του μορφή (NAD<sup>+</sup>) της καταλυτικής υπομονάδας της PARP. Η ολαπαρίμπη μοιάζει να έχει καλύτερα αποτελέσματα σε ασθενείς με ελαττωματικά τα γονίδια BRCA. Έτσι, η εταιρία AstraZeneca ξεκίνησε μια κλινική δοκιμή, Φάσης III, σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών (**Πίνακας 6-1, # 4**). Το Iniparib (BSI-201) είναι ένα προφάρμακο του 4-iodo-3-nitrosobenzamide, τις παράγοντα, ο οποίος εθεωρείτο ότι αναστέλλει με ομοιοπολική τροποποίηση την PARP1, προσδεδεμένος στον πρώτο δακτύλιο ψευδαργύρου τις πρωτεΐνης. Προκλινικές δοκιμές τις [136] καθώς και αποτυχημένες κλινικές δοκιμές (**Πίνακας 6-1, # 14-18**) έδειξαν αφενός ότι δεν είναι αναστολέας τις PARP και αφετέρου ότι δεν συνεισφέρει επαρκώς στη θεραπεία.

Το Rucaparib (AG-014699, PF-01367338) είναι ο πρώτος αναστολέας τις PARP που συνδυάστηκε σε κλινικές δοκιμές με το temozolomide<sup>23</sup>. Η ακτινο-ευαίσθητοποίηση που προκαλεί το rucaparib οφείλεται στην επικείμενη αναστολή τις ενεργοποίησης τις NF-κΒ, και είναι ανεξάρτητη τις αναστολής επιδιόρθωσης των ΜΚΘ. Το Rucaparib προσδένεται στην υπομονάδα NAD<sup>+</sup> τις PARP με τρεις δεσμούς υδρογόνου (**Πίνακας 6-1, # 19-20**).

Τις σχετικά τις αναστολέας των PARP ½ είναι το BMN 673, που έχει προταθεί ως περισσότερο δραστικό από τις παλαιότερους αναστολείς τις PARP και ως πιο επιλεκτικό

---

<sup>23</sup> Η τεμοζολομίδη (**temozolomide**) είναι μία τριαζίνη, που σε φυσιολογικό pH υπόκειται σε ταχεία χημική μετατροπή προς το δραστικό μονομεθυλ τριαζενοϊμιδαζολο καρβοξαμίδιο (MTIC). Πιστεύεται ότι η κυτταροτοξικότητα της MTIC οφείλεται κυρίως στην αλκυλίωση στη θέση O6 της γουανίνης με επιπλέον αλκυλίωση στη θέση N7. Οι κυτταροτοξικές βλάβες που ακολουθούν, πιστεύεται ότι περιλαμβάνουν μη φυσιολογική διόρθωση της μεθύλωσης.

Πηγή: [www.galinos.gr](http://www.galinos.gr)

στη θανάτωση καρκινικών κυττάρων που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/BRCA2 ή PTEN. Η δραστηριότητα του BMN 673 θεωρείται από 20 έως και 200 φορές ισχυρότερη από εκείνη των σύγχρονων φαρμάκων και τις έχει προταθεί από πρόσφατες αλλά και τρέχουσες κλινικές δοκιμές, τις για παράδειγμα η δοκιμή Φάσης III (**Πίνακας 6-1, # 24**) εκδηλώνει μικρή τοξικότητα.

Δεν είναι μόνο η PARP η πρωτεΐνη στόχος για τις αναστολές, από τις πρωτεΐνες του BER αλλά και η APE1. Αναστολές που στοχεύουν στην APE1 είναι οι Lucanthone, NSC13755, E3330, TRC102 [137]. Τα Lucanthone και TRC102 βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές Φάσης II.

Μία άλλη πιθανή πρωτεΐνη στόχος των αναστολέων από το μηχανισμό BER είναι η πολυμεράση Polβ. Αναστολές για αυτήν είναι τα KA-A, stigmasterol, edgeworin, και το βετουλινικό οξύ [137]. Αυτοί οι αναστολές δεν έχουν περάσει ακόμα στο στάδιο της κλινικής δοκιμής. Τις το cytarabine, ένα ευρέως γνωστό φάρμακο της χημειοθεραπείας, δρα και ως αναστολέας τις Polβ.

### **6.1.2 Αναστολές του Μηχανισμού Εκτομής Νουκλεοτιδίου**

Οι πρώτοι αναστολές του Μηχανισμού Εκτομής Νουκλεοτιδίου δεν στόχευαν το μηχανισμό καθεαυτόν αλλά προέκυψαν τυχαία. Τις πρώτους αναστολές συγκαταλέγονται τα F11782 [138], UCN-01 [139] και το Et743 [140], που τις έχουν χαρακτηριστεί ως αδύναμοι αναστολές. Πλέον η έρευνα για αναστολές του MEN στρέφεται στην αναστολή της δράσης τις ERCC1 των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά. Ο λόγος είναι πρότερες ενδείξεις που συσχετίζουν την ανθεκτικότητα των όγκων στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της ERCC1. Οι αναστολές του MEN μπορούν να χωρισθούν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ανήκουν οι αναστολές που στοχεύουν την αλληλεπίδραση των ERCC1-ΧΡΑ, με πιο αντιπροσωπευτικό αναστολέα της ομάδας αυτής τον NER101. Στη δεύτερη ομάδα ταξινομούνται οι αναστολές που στοχεύουν την αλληλεπίδραση των ERCC1-ΧΡΑ και ΧΡΑ ανήκουν στην ομάδα ΧΡ (xeroderma pigmentosum), η οποία εκτείνεται από την ΧΡ-Α έως την ΧΡ-Ε και λαμβάνουν μέρος στο MEN [62]. Οι αναστολές NER101 και NER102 δεν έχουν περάσει ακόμα σε κλινική δοκιμή.

### 6.1.3 Αναστολείς του Ομόλογου Ανασυνδυασμού

Σύμφωνα με τον Helleday, περισσότερες από 200 πρωτεΐνες συμμετέχουν στον Ομόλογο Ανασυνδυασμό [141] αλλά μόνο για μία από αυτές έχει βρεθεί ο ειδικός της αναστολέας [142]. Πρόκειται για την RAD54, της οποίας το streptonigrin, που είναι ένα αντικαρκινικό αντιβιοτικό αναστέλλει την *branch migration activity* [142]. Ωστόσο, κάποιες κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία βρίσκονται στο στάδιο της κλινικής δοκιμής φάνηκε ότι στοχεύουν και στον Ομόλογο Ανασυνδυασμό, μολονότι δεν σχεδιάστηκαν εξ αρχής για αυτόν το σκοπό. Μπορεί να ανατρέξει ο αναγνώστης στις επισκοπήσεις των Aziz *et al* [143], Chernikova *et al* [144].

Αναφέρονται στο σημείο αυτό τα erlotinib, gefitinib, που είναι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης και επηρεάζουν τον πυρηνικό εντοπισμό της RAD51 αλλά και της BRCA1. Επίσης οι αναστολείς βαλπροϊκό οξύ, PCI-24781 και 17-AAG επηρεάζουν την έκφραση και την ωρίμανση των RAD51 και BRCA1.

Από τους αναστολείς του Ομόλογου Ανασυνδυασμού, μόνο οι erlotinib, gefitinib, βαλπροϊκό οξύ και 17-AAG έχουν περάσει στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Μάλιστα, τα erlotinib και gefitinib έχουν περάσει σε δοκιμές Φάσης IV **Πίνακα 6-1**.

Τέλος αναφέρονται οι αναστολείς NU6027 και NU7026. Ο πρώτος αναστέλλει την ATR, παρόλο που αρχικά είχε σχεδιαστεί για να αναστείλει την CDK2. Ο δεύτερος, που τον έχει χρησιμοποιήσει και η ομάδα μας στο Ε.Μ.Π. [145] είναι ένας αναστολέας της DNA-PK (PRKDC), που οδηγεί στη συσσώρευση μη επιδιορθωμένων οξειδωτικών βλαβών DNA γύρω από τις δίκλωνες θραύσεις. Όπως έχει προταθεί από τους Peddi *et al.* εάν κατασταθεί η DNA-PK καταλυτικώς ανενεργή, τότε το αποτέλεσμα είναι η παρεμπόδιση της επεξεργασίας των βλαβών καθώς η DNA-PK αποτυγχάνει στο να αποσυνδεθεί από τα άκρα του DNA [145].

### 6.1.4 Αναστολείς της Μη Ομόλογης Ένωσης Ακρών

Το SCR7, ένας νέος και ελπιδοφόρος αναστολέας, που δεν έχει περάσει ακόμα σε κλινικές δοκιμές, προκαλεί απόπτωση μέσω της συσσώρευσης δίκλωνων θραύσεων. Το SCR7 προσκολλάται στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA της Lig IV και παρεμβάλλεται στην πρόσδεσή της με τις δίκλωνες θραύσεις. Οι Srivastava και συν. αναφέρουν αξιοσημείωτα αποτελέσματα στη θεραπεία μηρού, ύπατος και σπλήνας ποντικών με το SCR7. Παρατήρησαν υποχώρηση των όγκων χωρίς την παρουσία εμφανών παρενεργειών και αύξηση της διάρκειας ζωής των ποντικών κατά τέσσερις φορές [146].

Το ScFv 18-2 (single-chain variable fragment 18-2), ένας άλλος ελπιδοφόρος αναστολέας, έχει τη μορφή αντισώματος και την ιδιότητα να προσδένεται επιλεκτικά στην περιοχή ρύθμισης της DNA-PK, περδικλώνοντας το μηχανισμό Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων.

### **6.1.5 Αναστολείς της Επιδιόρθωσης Αναντιστοιχίας**

Φαίνεται να μην έχουν γίνει γνωστοί μέχρι στιγμής αναστολές του μηχανισμού της Επιδιόρθωσης Αναντιστοιχίας, κατάλληλοι για τη θεραπεία του καρκίνου. Κάποιοι αναστολείς που έχουν ερευνηθεί έδειξαν μεταλλαξογόνο και όχι θεραπευτική δράση. Υπάρχουν όμως κάποιες ενδείξεις για θεραπευτική αναστολή του μηχανισμού αυτού, στα πλαίσια της συνδυαστικής φονικότητας (synthetic lethality).

## **6.2 Συνδυαστική Φονικότητα**

Μέχρι στιγμής έχει παρουσιαστεί η έννοια της χημικής αναστολής των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA. Τι θα συμβεί όμως εάν ανασταλεί κάποιος μηχανισμός επιδιόρθωσης σε κύτταρα που έχουν ήδη ανενεργό ή ελλιπή κάποιον άλλον μηχανισμό; Αυτή η ιδέα κατοπιρίζει το φαινόμενο της Συνδυαστικής Φονικότητας (Synthetic Lethality), η οποία περιγράφεται ως τη συνεργηστική πρόκληση (κυτταρικού) θανάτου από δύο αιτίες που από μόνες τους δεν είναι θανατηφόρες. Οι πρωτεΐνες, παράγωγα γονιδίων που παρουσιάζουν Συνδυαστική Φονικότητα με γνωστές μεταλλάξεις, που δε μπορούν να προκληθούν από φάρμακα, αλλά προάγουν τον καρκίνο, θα πρέπει να αποτελούν τον ιδανικό στόχο αντικαρκινικών φαρμάκων για δύο λόγους. Πρώτον, μια θεραπευτική αγωγή βασισμένη στη Συνδυαστική Φονικότητα είναι ένας εκλεπτυσμένος τρόπος για έμμεση στόχευση καρκινικών κυττάρων που δεν είναι αντιμετωπίσιμα φαρμακευτικά, αξιοποιώντας τη χημική αναστολή παραγόντων για τους οποίους είναι εφικτή η φαρμακολογική πρόκληση Συνδυαστικής Φονικότητας. Το δεύτερο πλεονέκτημα έγκειται στην εκπληκτική επιλεκτικότητα που υπόσχεται η αξιοποίηση αλληλεπιδράσεων που όντως εκδηλώνουν Συνδυαστική Φονικότητα, για αντικαρκινική θεραπεία. Εξ ορισμού, η εξάλειψη μιας πρωτεΐνης, που είναι προϊόν κάποιου γονιδίου που εκδηλώνει Συνδυαστική Φονικότητα με ένα προϋπάρχον (δεδομένο) μεταλλαγμένο καρκινικό γονίδιο θα προκαλέσει την επιλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, αλλά θα είναι ανεκτή αυτή η εξάλειψη πρωτεΐνης από τα υγιή κύτταρα τα οποία δεν φέρουν αυτήν μετάλλαξη, η οποία χαρακτηρίζει μόνο τα καρκινικά κύτταρα. [144, 147]

### 6.2.1 Συνδυαστική Φονικότητα μεταξύ του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης και του Ομόλογου Ανασυνδυασμού

Η Συνδυαστική Φονικότητα μεταξύ των ΟΑ και ΜΕΒ μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους, είτε με χρήση αναστολέων του ΜΕΒ σε κύτταρα με ανεπάρκεια στον ΟΑ είτε αντιστρόφως. Η πρώτη περίπτωση είναι και η επικρατούσα με την αναστολή της PARP σε κύτταρα ελαττωματικά στο *BRCA1* (**Πίνακας 6-1**: # 1-3, 8-12, 22-24). Σύμφωνα με τη λογική της ΣΦ, η αναστολή της PARP προκαλεί τη συσσώρευση ΜΚΘ και επακολούθως ΔΚΘ οι οποίες γίνονται επιβλαβείς καθώς προϋπάρχει η ανεπάρκεια στα *BRCA1/2*, γονίδια του Ομόλογου Ανασυνδυασμού, που επιδιορθώνει τις ΔΚΘ. Υπάρχουν επίσης και άλλα εναλλακτικά σενάρια για την αξιοποίηση της ΣΦ. Σύμφωνα με νέα στοιχεία, η αναστολή της PARP μπορεί να προκαλέσει παγίδευση των μορίων της PARP1 πάνω σε άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης DNA, ειδικά κατά τη διάρκεια του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης. Η παγίδευση αυτή με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει κατάρρευση της διχάλας αντιγραφής, αφού αυτού του είδους το στρες αντιγραφής για να επιλυθεί χρειάζεται πρωτίστως να δράσει ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός, ο οποίος είναι εξαρτώμενος από την BRCA [148].

Στον **Πίνακα 6-1** παρουσιάζονται κλινικές δοκιμές που αξιοποιούν το φαινόμενο της ΣΦ. Από την προηγούμενη ανάλυση προκύπτει ότι στο μέλλον καλό είναι στη Χημειοθεραπεία αλλά και την Ακτινοθεραπεία να αποτελεί στόχο η αξιοποίηση της ΣΦ, με χρήση κάποιου αναστολέα επιδιόρθωσης. Επομένως, φαντάζει ιδεατός ο συνδυασμός των αναστολέων επιδιόρθωσης DNA με αντιμεταβολίτες νουκλεοσιδίων, ώριμους για κλινική εφαρμογή. Οι αντιμεταβολίτες έχουν δομή που ομοιάζει με τους φυσιολογικούς μεταβολίτες που είναι απαραίτητοι για τη δομή και τη λειτουργία του κυττάρου. Ενσωματώνονται σε νεοσχηματιζόμενο υλικό του πυρήνα ή ανταγωνίζονται ουσιώδη ένζυμα και παραβιάζουν έτσι την κυτταρική λειτουργία και διαίρεση [149]. Προτεινόμενοι αντιμεταβολίτες νουκλεοσιδίων είναι οι εξής: gemcitabine, fludarabine, fluorouracil, cytarabine, capecitabine, azacitidine, decitabine, clofarabine, pentostatin, nelarabine και fludarabine phosphate.

- Η γεμισταβίνη (gemcitabine) είναι αντιμεταβολίτης της πυριμιδίνης και μεταβολίζεται ενδοκυτταρικά από νουκλεοτιδικές κινάσες σε ενεργά διφωσφορικά (dFdCDP) και τριφωσφορικά (dFdCTP) νουκλεοτίδια. Η κυτταροτοξική δράση της γεμισταβίνης οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης του DNA μέσω δύο μηχανισμών δράσης των dFdCDP και dFdCTP [150].

- Η φλουνταραμπίνη (fludarabine) είναι ένα υδατοδιαλυτό φθοριούχο ανάλογο νουκλεοτιδίου του αντιϊικού παράγοντα βινταραμπίνη, 9-β-D-αραβινοφουρανοσυλαδενίνη (ara-A), που είναι σχετικά ανθεκτική στην απαμίνωση από απαμινάση αδενοσίνης. Η φωσφορική φλουνταραμπίνη αποφωσφορυλιώνεται ταχέως σε 2F-ara-A, η οποία προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται ενδοκυτταρικά από τη δεσοξυκυτιδινοκινάση προς το ενεργό τριφωσφορικό άλας, το 2F-ara-ATP. Ο μεταβολίτης αυτός δείχθηκε ότι αναστέλλει τη ρεδουκτάση των ριβονουκλεοτιδίων, την DNA πολυμεράση α/δ και ε, την DNA πριμάση και την DNA λιγάση, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση του DNA [151].
- Η φθοριουρακίλη (fluorouracil) είναι ανάλογο της πυριμιδινικής ουρακίλης και δρα επομένως σαν ανταγωνιστής της πυριμιδίνης, με αποτέλεσμα μείωση της σύνθεσης και της επιδιόρθωσης του DNA και τελικό αποτέλεσμα μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [152].
- Η κυταραβίνη (cytarabine) είναι νουκλεοτίδιο της αραβινοσίδης και ανήκει στην κατηγορία των αναλόγων της πυριμιδίνης κυτταροστατικών. Στον οργανισμό μεταβολίζεται σε τριφωσφορική νουκλεοτίδη, η οποία αναστέλλει την DNA πολυμεράση και εμποδίζει έτσι τη σύνθεση του DNA [153].
- Η καπεσιταβίνη (capecitabine) είναι μια μη-κυτταροτοξική καρβαμδική φθοριοπυριμιδίνη, η οποία λειτουργεί σαν ένας από του στόματος χορηγούμενος πρόδρομος της κυτταροτοξικής 5-φθοριουρακίλης (5-FU). Ο μεταβολίτης της καπεσιταβίνης ουσιαστικά παρεμποδίζει την αντίδραση μεθυλίωσης του δεοξουριδυλικού οξέος σε θυμιδυλικό οξύ, επηρεάζοντας έτσι περαιτέρω τη σύνθεση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) ενώ οδηγεί επίσης σε αναστολή σύνθεσης RNA και κατά συνέπεια πρωτεϊνοσύνθεσης [154].
- Η αζακτιδίνη (azacitidine) πιστεύεται ότι ασκεί τις αντινεοπλασματικές δράσεις της μέσω πολλαπλών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένης της αναστολής του DNA, RNA και της σύνθεσης πρωτεϊνών, της ενσωμάτωσης στο RNA και DNA και της ενεργοποίησης των οδών καταστροφής του DNA [155].
- Η Δεσιταβίνη είναι ένας υπομεθυλωτικός παράγοντας [156, 157]. Υπομεθυλώνει το DNA μέσω αναστολής της DNA μεθυλ-τρανσφεράσης. Λειτουργεί με ανάλογο τρόπο με την Αζακτιδίνη, όμως η Δεσιταβίνη μπορεί να ενσωματωθεί μόνο στους



κλώνους του DNA, ενώ η αζακιτιδίνη μπορεί να ενσωματωθεί και στις αλυσίδες του DNA και του RNA.

- Η κλοφαραβίνη (clofarabine) είναι πουρινικός νουκλεοσιδικός αντι-μεταβολίτης. Η κλοφαραβίνη προκαλεί αναστολή της DNA πολυμεράσης α που καταλήγει σε διακοπή της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA ή/και της σύνθεσης/επιδιόρθωσης του DNA, αναστολή της αναγωγάσης ριβονουκλεοτιδίου με μείωση κυτταρικών συγκεντρώσεων τριφωσφορικού δεοξυνουκλεοτιδίου (αNTP) και τέλος διάρρηξη της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης με απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και άλλων προ-αποπτωτικών παραγόντων που οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ακόμα και σε μη διαιρούμενα λεμφοκύτταρα [158].
- Η πεντοστατίνη (pentostatin) είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αδενοσινοδεαμινάσης (ADA). Η ADA εμφανίζει μεγάλη δραστηριότητα στα T-κύτταρα του λεμφικού συστήματος κι ακόμη μεγαλύτερη στις κακοήθειες των T-κυττάρων. Η πεντοστατίνη ουσιαστικά μειώνει τον καταβολισμό της αδενοσίνης και της δεοξαδενοσίνης, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του dATP ενδοκυτταρίως, το οποίο με τη σειρά του εμποδίζει τη σύνθεση του DNA [159].
- Η νελαραβίνη (nelarabine) είναι ένα προφάρμακο του αναλόγου δεοξυγουανοσίνης ara-G. Η νελαραβίνη απομεθυλιώνεται γρήγορα από την απαμινάση της αδενοσίνης (ADA) προς σχηματισμό του ara-G και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται ενδοκυτταρικά από την κινάση της δεοξυγουανοσίνης και την κινάση της δεοξυκυτιδίνης προς σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού μεταβολίτη του. Στη συνέχεια, ο μονοφωσφορικός μεταβολίτης μετατρέπεται στην ενεργό 5'-τριφωσφορική μορφή, το ara-GTP. Η συσσώρευση του ara-GTP στους λευχαιμικούς βλάστες επιτρέπει την εκλεκτική ενσωμάτωση του ara-GTP στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), οδηγώντας σε αναστολή της σύνθεσης του DNA. Αυτό οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο [160].
- Η φλουνταραμπίνη (fludarabine) είναι ένα υδατοδιαλυτό φθοριούχο ανάλογο νουκλεοτιδίου του αντιϊκού παράγοντα βινταραμπίνη, 9-β-D-αραβινοφουρανοσυλαδερίνη (ara-A), που είναι σχετικά ανθεκτική στην απαμίνωση από απαμινάση αδενοσίνης. Η φωσφορική φλουνταραμπίνη αποφωσφορυλιώνεται ταχέως σε 2F-ara-A, η οποία προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται ενδοκυτταρικά από τη δεοξυκυτιδινικινάση προς το ενεργό τριφωσφορικό άλας, το 2F-ara-ATP. Ο

μεταβολίτης αυτός δείχθηκε ότι αναστέλλει τη ρεδουκτάση των ριβονουκλεοτιδίων, την DNA πολυμεράση  $\alpha/\delta$  και  $\epsilon$ , την DNA πριμάση και την DNA λιγάση, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση του DNA [151].

Στον **Πίνακα 6-1** παρατίθενται πρόσφατες κλινικές μελέτες όπου δοκιμάζονται αναστολείς επιδιόρθωσης του DNA. Για κάθε αναστολέα παρουσιάζεται η πρωτεΐνη έναντι στην οποία δρα, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης που αναστέλλεται καθώς και το είδος του καρκίνου. Αναφέρεται επίσης το στάδιο της κλινικής δοκιμής και εξετάζεται εάν αξιοποιείται η ιδέα της ΣΦ.

Αν και η ΣΦ μπορεί να εκφραστεί με διάφορους τρόπους, ο **Πίνακας 6-1** αναφέρεται σε ΣΦ μεταξύ των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Συνεργηστική δράση, όμως, εκδηλώνεται σε κάθε δοκιμή, είτε ως συνδυασμένη θεραπεία (αναστολέας και χημειοθεραπεία/ακτινοθεραπεία) είτε ως ΣΦ (αναστολέας και ανεπάρκεια επιδιόρθωσης του DNA) είτε και τα τρία. Για παράδειγμα, στον **Πίνακα 6-1** η πρώτη καταχώρηση αναφέρεται στη δοκιμή της Βελιπαρίμπης (ABT-888), ενός κοινού αναστολέα της PARP inhibitor, σε ομάδες ασθενών με καρκίνο του μαστού, φέροντες τη μετάλλαξη *BRCA1/2*. Αυξημένο ενδιαφέρον παρατηρείται στην έρευνα για την αναστολή της PARP (Μηχανισμός EB) σε υπόβαθρο ανεπάρκειας στον Ομόλογο Ανασυνδυασμό. Ο συνδυασμός αυτός φαίνεται πως είναι ελπιδοφόρος για καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών και των σαλπίνγων. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των παθήσεων είναι ότι προέρχονται συνήθως από μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1/2*, τα οποία κωδικοποιούν και τις ομώνυμες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες *BRCA1/2* ανήκουν στον Ομόλογο Ανασυνδυασμό που είναι μηχανισμός επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων του DNA.

Πίνακας 6-1: Τρέχουσες και πρόσφατες κλινικές δοκιμές σε αναστολείς επιδιόρθωσης του DNA ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμένη θεραπεία με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις δοκιμές που προσδοκούν στην ιδέα της Συνδυαστικής Φονικότητας.

#	Παράγοντας (εταιρία)	Μόριο ή μηχανισμός που στοχεύεται	Παράγοντας (εξ) Μονοθεραπείας ή συνδυασμένης θεραπείας	Είδος καρκίνου	Σ. Φονικότητα		Φάση της κλ. δοκιμής, τρέχουσα ή εσχάτως ολοκληρωθείσα	Ταυτότητα δοκιμής
					Αναστέλλόμενος Μηχανισμός	Ανεπαρκής Μηχανισμός		
1	Veliparib (ABT-888)	BER/ PARP	Temozolomide	(Μεταστατικός) καρκίνος του μαστού	BER	HR (BRCA)	Φάση II (τρέχουσα)	[161] <a href="#">NCT01009788</a>
2	ABT-888 (Abbott Laboratories)	PARP	Temozolomide	Μελάνωμα, κ. μαστού, ωθηκών, πρωτοπαθής κ. του περιτόναιου, κ. στις σάλπιγγες, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	BER	HR (BRCA)	Φάση I (2012)	[162] <a href="#">NCT00526617</a>
3	ABT-888	PARP	Cyclophosphamide	Κ. ωθηκών, πρωτοπαθές ορώδες καρκίνωμα του περιτόναιου, τριπλά αρνητικός κ. του μαστού, κ. στις σάλπιγγες	BER	HR (BRCA)	Φάση II (2016)	[163] <a href="#">NCT01306032</a>
4	ABT-888	PARP	Cyclophosphamide	Νεοπλασμάτα, λέμφωμα	no		Φάση I (2011-2014)	[164] <a href="#">NCT01445522</a>
5	ABT-888	PARP	Topotecan hydrochloride	Ανθεκτικοί συμπαγείς όγκοι και λεμφώματα	no		Φάση I (2007-2011)	[165] <a href="#">NCT00553189</a>
6	Veliparib (ABT-888)	PARP	Gemcitabine και ακτινοθεραπεία	Κ. του παγκρέατος	no		Φάση I (τρέχουσα)	[166] <a href="#">NCT01908478</a>
7	Veliparib (ABT-888)	PARP	Capecitabine και ακτινοθεραπεία	Τοπικά προχωρημένος κ. του ορθού	No		Φάση I (2015)	[167] <a href="#">NCT01589419</a>
8	Veliparib (ABT-888)	PARP	Carboplatin Paclitaxel Doxorubicin Cyclophosphamide	Τριπλά αρνητικός κ. του μαστού	BER	HR (BRCA)	Φάση III (τρέχουσα)	[168] <a href="#">NCT02032277</a>
9	AZD2281 (Olaparib)	FA/BRCA μονοπάτι επιδιόρθωσης DNA	Παράγοντες βλάβης του DNA: irinotecan, cisplatin, mitomycin C (ICM)	Προχωρημένος κ. του παγκρέατος	BER		Φάση I (2016)	[169] <a href="#">NCT01296763</a>
					HR & Fanconi			

10	<b>Olaparib/ Placebo</b>	PARP	Μονοθεραπεία	Υποτροπιάζων, ευαίσθητος στην πλατίνα καρκίνος των ωοθηκών Πλήρης ή μερική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με πλατίνα	BER HR (BRCA)	Φάση III (τρέχουσα)	[170] <a href="#">NCT01874353</a>
11	<b>Olaparib (AstraZeneca)</b>	PARP	Μονοθεραπεία	Μη μικροκυτταρικός κ. του πνεύμονα (ΜΜΚΚΠ)	BER ΜΜΚΚΠ	Φάση II (μη ενημερ/νη β. δεδ/νων)	[171] <a href="#">NCT01788332</a>
12	<b>Olaparib (AstraZeneca)</b>	PARP	Μονοθεραπεία	Καρκίνος του μαστού	BER HR (BRCA)	Φάση III (δέχεται συμμ/ντες)	[172] <a href="#">NCT02032823</a>
13	<b>Olaparib (AZD2281)</b>	PARP	Temozolomide	Όγκοι στον εγκέφαλο και το ΚΝΣ	όχι	Φάση I (δέχεται συμμ/ντες)	[173] <a href="#">NCT01390571</a>
14	<b>BSI-201 (Iniparib) (Bipar Sciences)</b>	PARP	Gemcitabine-Carboplatin	Κ. του μαστού	όχι	Φάση II (2007-2012)	[174] <a href="#">NCT00540358</a>
15	<b>BSI-201 (Iniparib) Bipar sciences</b>	BER/PARP1	Temozolomide	Κακήθης γλοιώμα	όχι	Φάση I/ II (2015)	[175] <a href="#">NCT00687765</a>
16	<b>SAR240550 (BSI-201-Iniparib)</b>	PARP1	Gemcitabine/ Cisplatin	Μη μικροκυτταρικός κ. του πνεύμονα, στο 4 <sup>ο</sup> στάδιο	όχι	Φάση II (2010-2013)	[176] <a href="#">NCT01086254</a>
17	<b>Iniparib</b>	PARP	Gemcitabine/ Carboplatin	Τριπλά αρνητικός κ. του μαστού	όχι	Φάση III (2009-2013)	[177] <a href="#">NCT00938652</a>
18	<b>Iniparib</b>	PARP	Gemcitabine/ Carboplatin	καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα	όχι	Φάση III (2010-2013)	[178] <a href="#">NCT01082549</a>
19	<b>AG014699 (Rucaparib-Pfizer)</b>	PARP	Temozolomide	Συμπαγείς όγκοι/μελάνωμα	όχι	Φάση I (2003-2005)	[179] <a href="#">CRUKD/03/02</a>
20	<b>Rucaparib</b>	PARP	Μονοθεραπεία	Κ. των ωοθηκών, των σαλπγγων και του περιτόναιου	BER HR(BRCA)	Φάση III (τρέχουσα)	[180] <a href="#">NCT01968213</a>
21	<b>INO-1001 (Inotek)</b>	PARP	Temozolomide	Ανεγχείρητο μελάνωμα στο 3 <sup>ο</sup> ή το 4 <sup>ο</sup> στάδιο	BER NER(XP)	Φάση IB (2009)	[181] -
22	<b>BMN 673</b>	PARP	Μονοθεραπεία	Προχωρημένοι ή υποτρ/ζοντες συμπαγείς όγκοι	BER HR(BRCA)	Φάση I (τρέχουσα)	[182] <a href="#">NCT01286987</a>
23	<b>BMN 673</b>	PARP	Μονοθεραπεία		BER		

				Προχωρημένος κ. ωοθηκών/μαστού Πρωτοπαθής κ. του περιτόναιου Προχωρημένοι συμπαγείς όγκοι	HR(BRCA)	Φάση I Φάση II (τρέχουσα)	[183] <a href="#">NCT01989546</a>
24	<b>BMN 673</b>	PARP	Capecitabine/ Eribulin/ Gemcitabine/ Vinorelbine	Νεοπλασίες του μαστού Γονιδιακή μετάλλαξη στο <i>BRCA1</i> Γονιδιακή μετάλλαξη στο <i>BRCA2</i>	BER HR(BRCA)	Φάση III (δέχεται συμμ/ντες)	[184] <a href="#">NCT01945775</a>
25	<b>Lucanthone</b>	BER/APE1	Ακτινοθεραπεία	Μεταστάσεις του εγκεφάλου Μη μικροκυτταρικός κ. του πνεύμονα	όχι	Φάση II (έχει αναστείλει συμμ/ντων)	[185] <a href="#">NCT02014545</a>
26	<b>TRC-102 (Tracon Pharma)</b>	BER/APE1	Temozolomide	Συμπαγείς όγκοι	όχι	Φάση I (τρέχουσα)	[186] <a href="#">NCT00892385</a>
			Pemetrexed	Νεόπλασμα	όχι	Φάση I (2008-2010)	[187] <a href="#">NCT00692159</a>
27	<b>TRC-102 (Tracon Pharma)</b>	BER/APE1	Temozolomide	Λεμφώματα Υποτροπιάζοντες συμπαγείς όγκοι	όχι	Φάση I (δέχεται συμμ/ντες)	[188] <a href="#">NCT01851369</a>
28	<b>Et743 (Trabectedin)</b>	NER	DOXIL Dexamethasone	Κ. των ωοθηκών	όχι	Φάση III (2005-2013)	[189] <a href="#">NCT00113607</a>
29	<b>Et743 (Trabectedin)</b>	NER	DOXIL Dexamethasone	Νεοπλάσματα των ωοθηκών Περιτοναϊκά νεοπλάσματα Νεοπλάσματα στις σάλπιγγες	όχι	Φάση III (δέχεται συμμ/ντες)	[190] <a href="#">NCT01846611</a>
30	<b>Et743 (Trabectedin)</b>	NER	Dacarbazine	Προχωρημένο ή μεταστατικό λιποσάρκωμα ή λειομυοσάρκωμα	όχι	Φάση III (τρέχουσα)	[191] <a href="#">NCT01692678</a>
31	<b><u>Dbait</u></b>	HR NBS1, P53	Ακτινοθεραπεία	Μελάνωμα	όχι	Φάση I	[192] <a href="#">Curie.fr</a>
32	<b>Erlotinib</b>	HR	Gemcitabine/ Cisplatin	Μη μικροκυτταρικός κ. του πνεύμονα	όχι	Φάση IV (2015)	[193] <a href="#">NCT02000531</a>
33	<b>Gefitinib</b>	HR	Cisplatin ή Carboplatin	Μη μικροκυτταρικός κ. του πνεύμονα	όχι	Φάση IV (2008-2012)	[194] <a href="#">NCT00770588</a>
34	<b>SC-58635</b>	Chk1	Cytarabine	Υποτροπιάζουσα οξεία μυελώδης λευχαιμία	σημείο ελ. κυττ, κύκλου S και G2/M Πολλαπλές DDR ανεπάρκειες	Φάση II (2016)	[195] <a href="#">NCT01870596</a>

Όπως έχει προταθεί και από τους O'Sullivan *et al.* οι αναστολείς της PARP βρίσκουν κλινική εφαρμογή και ως μονοθεραπεία ή ως συνδυασμένη θεραπεία όχι μόνο σε ασθενείς με την προαναφερθείσα μετάλλαξη στα *BRCA1/2* αλλά και σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους που σχετίζονται με γενικότερη ανεπάρκεια σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Τέτοιοι συμπαγείς όγκοι είναι εκείνοι που αναπτύσσονται σε όργανα όπως ο προστάτης, οι πνεύμονες, το ενδομήτριο και το πάγκρεας [196].

Παρατίθενται στο σημείο αυτό κάποιοι χαρακτηριστικοί αναστολείς των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA.

Η βελυπαρίμπη (*veliparib*), που είναι αναστολέας της PARP, πρωτεΐνης του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης (BER), στον **Πίνακα 6-1, # 1-4 & 8** συνδυάζεται με τους αλκυλιωτικούς παράγοντες *temozolomide* και *cyclophosphamide* ή το *carboplatin*. Συνεπώς η συνεργηστική δράση εκδηλώνεται μεταξύ της ιδιότητας των αλκυλιωτικών παραγόντων να αλλοιώνουν τις βάσεις γουανίνης και του αναστολέα που εναντιώνεται στο μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την επιδιόρθωση των βάσεων, δηλαδή το μηχανισμό BER. Η αντικαρκινική δραστηριότητα ενισχύεται από την προϋπάρχουσα ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων μέσω του Ομόλογου Ανασυνδυασμού λόγω της μετάλλαξης των γονιδίων *BRCA1/2*.

Η βελυπαρίμπη (**Πίνακας 6-1, # 6-7**) δοκιμάζεται και με το *gemcitabine* ή το *capecitabine*, τα οποία είναι αντιμεταβολίτες νουκλεοσιδίων<sup>24</sup> μαζί με ακτινοθεραπεία. Σε αυτές τις περιπτώσεις η συνέργεια προκύπτει από την παρεμπόδιση της επιδιόρθωσης του DNA καθώς και την παρακώλυση της δημιουργίας νέων νουκλεοσιδίων, στο ήδη ακτινοβολημένο DNA.

Η ολαπαρίμπη (*olaparib*), επίσης αναστολέας της PARP από το μηχανισμό BER, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 6-1, # 9** χορηγούμενη μαζί με τα *irinotecan*, *cisplatin*, *mitomycin C*, που από κοινού αποκαλούνται ICM. Το *irinotecan* εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της παρακώλυσης της TOP1<sup>25</sup>. Το *cisplatin* είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας και η μιτομυκίνη C (*mitomycin C*) συνδέεται με το DNA των καρκινογόνων κυττάρων και αναστέλλει τη διαίρεση του DNA με το σχηματισμό συμπλόκου με αυτό [198].

---

<sup>24</sup> **Αντιμεταβολίτης νουκλεοσιδίων:** μεταβολικός αναστολέας που εμποδίζει τη δημιουργία ή τη λειτουργία νουκλεοσιδίων (νουκλεοσίδιο: ένα νουκλεοτίδιο χωρίς τη φωσφορική του ομάδα)

<sup>25</sup> **TOP1:** DNA Topoisomerase 1: ένζυμο που ελέγχει και μεταβάλλει την τοπολογική διευσθέτηση του DNA κατά τη μεταγραφή. Το ένζυμο αυτό καταλύει το παροδικό σπάσιμο και επανακόλληση του μονόκλωνου DNA, επιτρέποντας στους κλώνους να περνούν ο ένας μέσα από τον άλλον, μεταβάλλοντας έτσι την τοπολογία του DNA [197].

Αξιοσημείωτο είναι το ότι η ολαπαρίμπη έχει κατορθώσει να περάσει σε κλινικές δοκιμές Φάσης III (**Πίνακας 6-1, # 10&12**).

Η ολαπαρίμπη μπορεί επίσης να δοθεί ως μονοθεραπεία μετά από χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία για να αποτρέψει την επανεμφάνιση του καρκίνου ή τη μετάσταση.

Ωραίο παράδειγμα συνεργηστικής δράσης αποτελεί η κλινική δοκιμή που παρουσιάζεται στη θέση 21 του **Πίνακα 6-1**. Ένας αναστολέας του Μηχανισμού Εκτομής Βάσης, ο INO-1001, χορηγείται μαζί με τον αλκυλιωτικό παράγοντα τεμοζολομίδη, σε υπόβαθρο ανεπάρκειας του Μηχανισμού Εκτομής Νουκλεοτιδίων. Σε αυτή την περίπτωση το πρωτεύον φάρμακο προκαλεί βλάβες βάσεων αλλά και οι δύο εναλλακτικοί μηχανισμοί που επιδιορθώνουν βλάβες βάσεων (MEB και MEN) είναι απενεργοποιημένοι.

Το BMN 673, ένας άλλος αναστολέας της PARP είναι σήμερα σε μία κλινική δοκιμή Φάσης I (**Πίνακας 6-1, # 22**) ως μονοθεραπεία, με σκοπό να προσδιοριστεί η ασφάλειά του, η φαρμακοκινητική, η φαρμακοδυναμική και η αρχική αποτελεσματικότητά του. Ο αναστολέας αυτός χρησιμοποιούμενος ως μονοθεραπεία προκαλεί σύνθετη θνητότητα σε κύτταρα τα οποία είναι ανεπαρκή στα *BRCA1/2* και *PTEN* [199].

Σε μια κλινική δοκιμή Φάσης III (**Πίνακας 6-1, # 24**) ελέγχεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του BMN 673 σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο και/ή με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, φέροντες μεταλλάξεις βλαστικής σειράς<sup>26</sup> στο *BRCA*. Το φάρμακο της χημειοθεραπείας σε αυτή τη μελέτη μπορεί να είναι ένα από τα ακόλουθα *capecitabine*, *eribulin*, *gemcitabine* ή *vinorelbine*.

Το Dbait είναι ένας αναστολέας του Ομόλογου Ανασυνδυασμού άξιος προσοχής (**Πίνακας 6-1, # 31**). Παρόλο που η δράση του δεν είναι η κλασική δράση αναστολέα, δηλαδή η στόχευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης του Ομόλογου Ανασυνδυασμού ή της Μη Ομόλογης Ένωσης Άκρων κατορθώνει να αναστείλει τη δραστικότητα και των δύο μηχανισμών που επιδιορθώνει τις δίκλωνες θραύσεις. Στην ουσία είναι ένα ραδιομιμητικό φάρμακο, δηλαδή μιμείται τα αποτελέσματα που φέρνει η ιοντίζουσα ακτινοβολία στο DNA, δηλαδή τις δίκλωνες θραύσεις. Αποτελείται από μικρά ελεγχόμενου μεγέθους τμήματα DNA τα οποία το κύτταρο αναγνωρίζει ως δίκλωνες θραύσεις. Η χορήγηση του φαρμάκου όταν συνδυάζεται με ακτινοθεραπεία αυξάνει κατά πολύ τον αριθμό των δίκλωνων θραύσεων που αντιλαμβάνεται το κύτταρο από αυτές που στην

---

<sup>26</sup> **Μετάλλαξη βλαστικής σειράς (germline mutation):** μετάλλαξη που συμβαίνει σε γαμετικό κύτταρο, το οποίο εάν συμμετάσχει σε γονιμοποίηση, ο απόγονος θα φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη σε κάθε του κύτταρο [200].

πραγματικότητα έχει προξενήσει η ακτινοθεραπεία. Το αποτέλεσμα είναι το κύτταρο να οδηγείται σε απόπτωση. Το Dbaït παρουσιάζει εξαιρετική επιλεκτικότητα στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων [192].

Το SCH 900776 είναι ένας επιλεκτικός αναστολέας της Chk1<sup>27</sup> ο οποίος ενισχύει τη αντιπολλαπλασιαστική δράση της κυταραβίνης σε κύτταρα AML<sup>28</sup>. Η δράση της κυταραβίνης είναι να αναστέλλει τη σύνθεση του DNA. Η συνέργεια εκδηλώνεται συνδυασμό με τις πολλαπλές ανεπάρκειες στην επιδιόρθωση του DNA που εκδηλώνουν οι ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (**Πίνακας 6-1, # 34**).

Αν αναλογιστεί κανείς το μεγάλο πλήθος των ενζύμων που περιέχει η οικογένεια πρωτεϊνών PARP συν το γεγονός ότι οι αναγνωρισμένοι αναστολείς έναντι των PARP είναι πάνω από 185 προκύπτει το ερώτημα για την επιλεκτικότητα κάθε ενός από αυτά φάρμακα [202]. Η βελυπαρίμμη (veliparib/ ABT-888) θεωρείται μακράν ο πιο επιλεκτικός αναστολέας των PARP1/2.

Είναι δύσκολο να προβλεφθεί το πλήρες φάσμα των βιολογικών φαινομένων και των παρενεργειών που προκαλούν οι αναστολείς στους ασθενείς. Οι περισσότεροι αναστολείς γίνονται εύκολα ανεκτοί από τον οργανισμό και παρουσιάζουν ελάχιστη τοξικότητα. Για παράδειγμα στις παρενέργειες της ολαπαρίμμης περιλαμβάνονται η ναυτία, ο εμετός, η κόπωση και η αναιμία (χαμηλός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων) τα οποία συνήθως είναι διαχειρίσιμα [203].

Για το iniparib έχουν αναφερθεί πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η ουδετεροπενία, η θρομβοκυτταροπενία, η αναιμία, η κόπωση, η λευκοπενία και άλλα. Σύμφωνα με μια πρόσφατη επισκόπηση [196] οι πιο συχνές παρενέργειες των αναστολέων της PARP είναι η διάρροια, η αναφυλαξία και η ακμή.

---

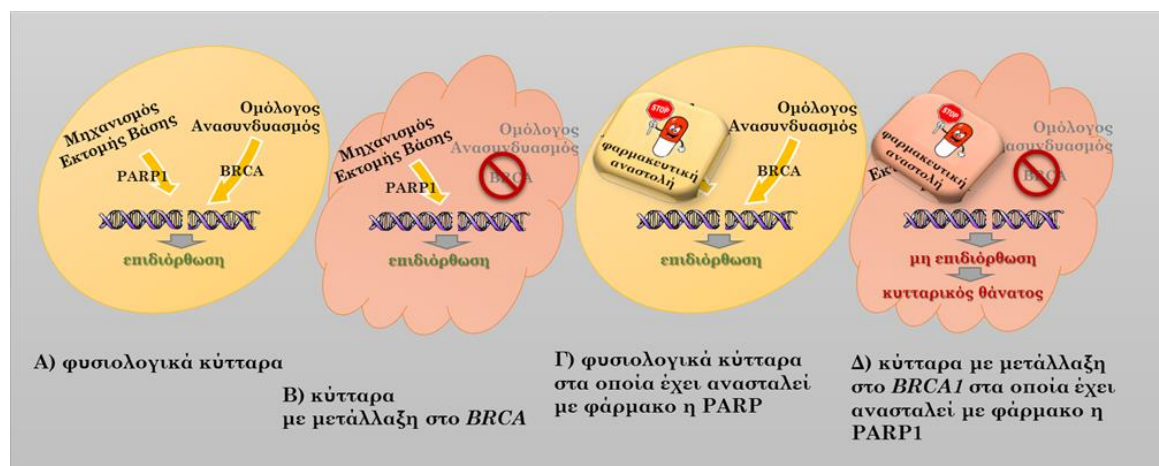
<sup>27</sup> **Chk1 (Checkpoint Kinase 1):** Πρωτεΐνη απαραίτητη για τη λειτουργία του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μεταξύ των φάσεων G1 και S [201].

<sup>28</sup> **AML (acute myeloid leukemia):** οξεία μυελογενής λευχαιμία



### 6.3 Μελλοντικές κατευθύνσεις για τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης

Ο προσδιορισμός νέων πρωτεϊνών για να αποτελέσουν άμεσους ή έμμεσους στόχους αναστολέων θα ανοίξει νέους ορίζοντες στη θεωρία του καρκίνου. Με τον όρο άμεση αναστολή εννοούμε την αναστολή όπως περιγράφεται στις κλινικές δοκιμές που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα, δηλαδή την αναστολή την εξειδικευμένη σε κάποια πρωτεϊνική λειτουργία. Με τον όρο έμμεση αναστολή ενός μηχανισμού θέλουμε να εισάγουμε την έννοια της Πολλαπλής Φονικότητας, όταν η αναστολή ενός μηχανισμού, φέρ' ειπείν του ΑΟ θα επηρεάζει και κάποιον δεύτερο μηχανισμό, όπως το ΜΕΒ ή το ΜΕΝ. Σύμφωνα με τους Peddi *et al.* [145] η στοχευμένη αναστολή έναντι της DNA-PKcs του μηχανισμού ΜΟΕΑ σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα έδειξε παράλληλη διατάραξη του ΜΕΒ και της επεξεργασίας των ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η εργασία που δημοσίευσαν οι Albaracati *et al.* [204], όπου βρήκαν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη BRCA1 του Ομόλογου Ανασυνδυασμού ρυθμίζει επίσης και το Μηχανισμό Εκτομής Βάσης.



Εικόνα 6-1: Η ιδέα στις συνδυαστικής Φονικότητας, παράδειγμα με δύο πρωτεΐνες επιδιόρθωσης PARP1 από το Μηχανισμό Εκτομής Βάσης και BRCA από τον Ομόλογο Ανασυνδυασμό.

Σε πολλές περιπτώσεις πρωτεΐνες που είναι γνωστές να συμμετέχουν στον ΟΑ ή στη ΜΟΕΣ, δηλαδή πρωτεΐνες για την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων φάνηκε ότι αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες του ΜΕΒ, όπως οι XRCC1, polβ, APE1 και άλλες [204]. Η παρατήρηση αυτή ανοίγει νέους δρόμους στη θεραπεία. Για παράδειγμα, στην περίπτωση όγκου με ανεπάρκεια στο γονίδιο BRCA1 η αναστολή της DNA-PKcs μπορεί να επιδράσει σημαντικά και σε άλλα μονοπάτια επιδιόρθωσης όπως στο ΜΕΒ ή/και στο ΜΕΝ, μειώνοντας την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επιδιορθώσουν όχι μόνο τις

δίκλωνες θραύσεις αλλά και τις άλλες βλάβες όπως τις ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες, μεγιστοποιώντας την αποτελεσματικότητα στη θανάτωση των κυττάρων.

### 6.3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση για την Πολλαπλή Φονικότητα

Προς αυτήν την κατεύθυνση για διατυπώσουμε την Πολλαπλή Φονικότητα, κάναμε βιοπληροφορική ανάλυση για να βρούμε γονίδια κοινά μεταξύ των μηχανισμών επιδιόρθωσης.

Για τον προσδιορισμό των κοινών γονιδίων, αρχικά βρήκαμε τα γονίδια του κάθε μηχανισμού. Για το σκοπό αυτό αρχικά προσδιορίσαμε τους πιθανούς (gene ontology terms)

1. Από τη βάση δεδομένων οντολογίας AMIGO2 [205] προσδιορίσαμε τους gene ontology terms που ενδεχομένως να μας ενδιαφέρουν. Οι όροι που επελέγησαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα

*Πίνακας 6-2: Αρχική επιλογή όρων γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology terms) από τη βάση AMIGO2 [205]. Οι όροι αυτοί αφορούν τους Μηχανισμούς Επιδιόρθωσης του DNA.*

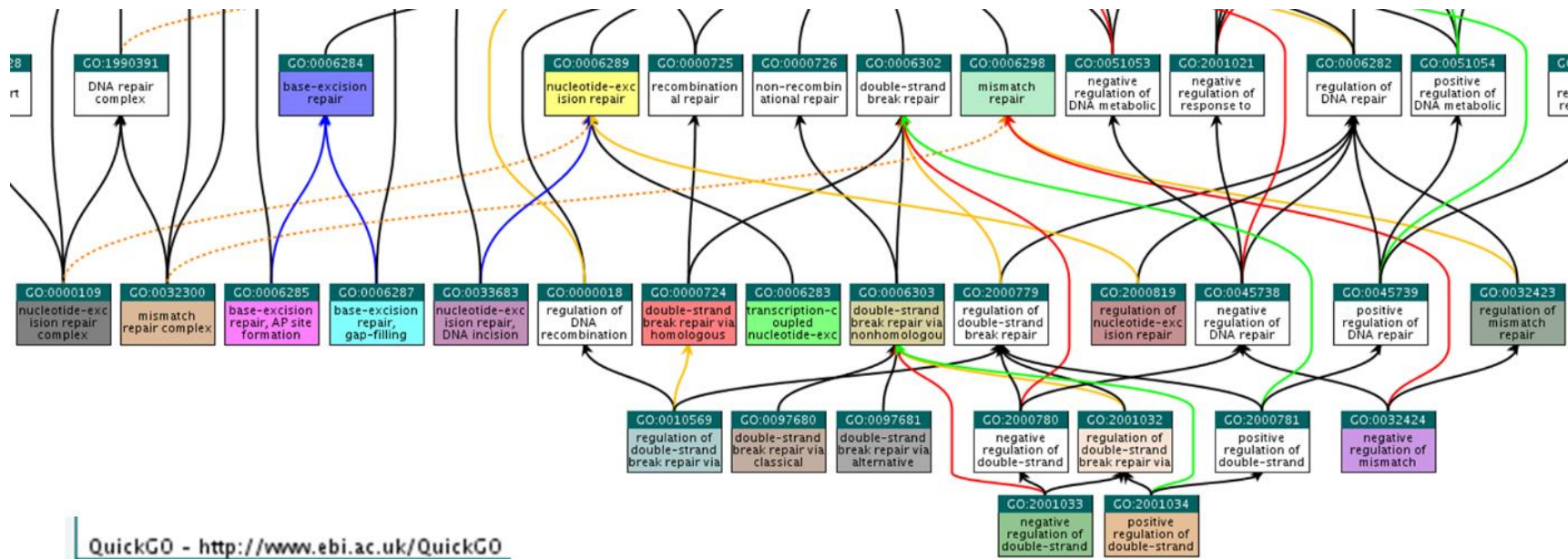
Λήμμα GO	Annotation
GO:0006284	base-excision repair
GO:0006285	base-excision repair, AP site formation
GO:0006287	base-excision repair, gap-filling
GO:0006289	nucleotide-excision repair
GO:0006283	transcription-coupled nucleotide-excision repair
GO:0000109	nucleotide-excision repair complex
GO:2000819	regulation of nucleotide-excision repair
GO:0033683	nucleotide-excision repair, DNA incision
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination
GO:0010569	regulation of double-strand break repair via homologous recombination
GO:0006303	double-strand break repair via nonhomologous end joining
GO:0097681	double-strand break repair via alternative nonhomologous end joining
GO:0097680	double-strand break repair via classical nonhomologous end joining
GO:2001032	regulation of double-strand break repair via nonhomologous end joining
GO:2001034	positive regulation of double-strand break repair via nonhomologous end joining
GO:2001033	negative regulation of double-strand break repair via nonhomologous end joining
GO:0006298	mismatch repair
GO:0032300	mismatch repair complex
GO:0032424	negative regulation of mismatch repair
GO:0032423	regulation of mismatch repair

2. Στη συνέχεια από το EMBL-EBI, QuickGO [206] αφότου εισαγάγαμε τους όρους του προηγούμενου πίνακα, δημιουργήσαμε ένα «δέντρο προγόνων» (ancestor tree of GO terms) που βρίσκει τους όρους γεννήτορες για τον κάθε έναν (**Σχήμα 6-1**).
3. Από το δέντρο των προγόνων ελαττώσαμε τους όρους που μας ενδιαφέρουν, αφού κάποιος από αυτούς περιέχονται σε άλλους. Έτσι οι όροι που έμειναν είναι οι ακόλουθοι (**Πίνακας 6-3**):

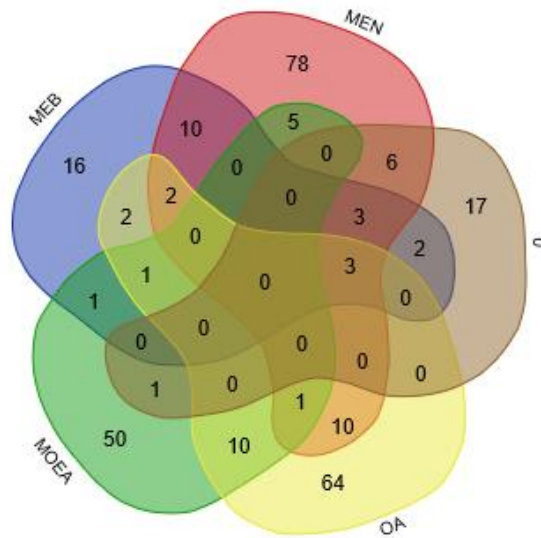
*Πίνακας 6-3: Τελική επιλογή όρων γονιδιακής οντολογίας για τους Μηχανισμούς Επιδιόρθωσης του DNA*

<b>Λήμμα GO</b>	<b>Annotation</b>	<b>Περιγραφή</b>
GO:0006284	base-excision repair	Μηχανισμός Εκτομής Βάσης
GO:0006289	nucleotide-excision repair	Μηχανισμός Εκτομής Νουκλεοτιδίου
GO:0006298	mismatch repair	Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination	Επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων μέσω του Ομόλογου Ανασυνδυασμού
GO:0006303	double-strand break repair via nonhomologous end joining	Επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων μέσω της Μη Ομόλογης Ένωσης Άκρων

4. e!Ensembl> Biomart> Dataset: Human genes (GRCh38.p7)> Filter: GOterm> Attributes: HGNC symbol  
Για κάθε έναν όρο γονιδιακής οντολογίας βρήκαμε τα γονίδια που περιέχει. Αναλυτικά τα γονίδια αυτά παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**.
5. Δημιουργήσαμε το διάγραμμα Venn για τα γονίδια του κάθε μηχανισμού, με το “DrawVenn application” [207] (**Σχήμα 6-2**).



Σχήμα 6-1: Δέντρο των προγόνων για τους όρους γονιδιακής οντολογίας που αναφέρονται στον Πίνακα III-5. Η δημιουργία του δέντρου αποσκοπεί στο να εξαιρεθούν από τη συνέχεια οι όροι εκείνοι για τους οποίους έχει επίσης επιλεγεί κάποιος πρόγονός τους, καθώς όλα τα γονίδια που περιέχει ένας όρος, περιέχονται επίσης (μεταξύ άλλων) σε κάθε του πρόγονο.



Σχήμα 6-2: Διάγραμμα Venn των γονιδίων που περιέχει κάθε όρος γονιδιακής οντολογίας που αναφέρεται στον Πίνακα III-6.

Πίνακας 6-4: Κοινά γονίδια μεταξύ των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. (Περιέχονται οι συνδυασμοί που περιλαμβάνουν δύο μηχανισμούς). Έχουν υπογραμμιστεί τα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο σύμφωνα με τη βάση δεδομένων COSMIC [208].

MEB	MEB	MEB	MEB	MEN	MEN	MEN	EA	OA
MEN	EA	OA	MOEA	EA	OA	MOEA	MOEA	MOEA
<u>TP53</u>	<u>TDG</u>	<u>SIRT6</u>	<u>HMGA2</u>	<u>POLD2</u>	<u>HUS1</u>	<u>SUMO1</u>	<u>MLH1</u>	<u>NBN</u>
<u>NEIL2</u>	<u>MUTYH</u>	<u>FEN1</u>		<u>ERCC1</u>	<u>FAN1</u>	<u>POLL</u>		<u>SMC5</u>
<u>NEIL1</u>				<u>PCNA</u>	<u>RAD51D</u>	<u>LIG4</u>		<u>KDM4D</u>
<u>NTHL1</u>				<u>POLD3</u>	<u>BRCA2</u>	<u>PRPF19</u>		<u>NSMCE2</u>
<u>NEIL3</u>				<u>XPC</u>	<u>ERCC4</u>	<u>UBE2V2</u>		<u>BRCA1</u>
<u>XPA</u>				<u>POLD4</u>	<u>RAD52</u>			<u>ATM</u>
<u>POLB</u>					<u>SLX4</u>			<u>MRE11</u>
<u>OGG1</u>					<u>HUS1B</u>			<u>H2AFX</u>
<u>ERCC6</u>					<u>RBBP8</u>			<u>RAD50</u>
<u>POLE</u>					<u>PARP1</u>			<u>PSMD14</u>

Πίνακας 6-5: Κοινά γονίδια μεταξύ των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. (Περιέχονται οι συνδυασμοί που περιλαμβάνουν πάνω από δύο μηχανισμούς). Έχουν υπογραμμιστεί τα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο σύμφωνα με τη βάση δεδομένων COSMIC [208].

<b>MEB</b>				
<b>MEN</b>	<b>MEB</b>	<b>MEB</b>	<b>MEB</b>	<b>MEN</b>
<b>EA</b>	<b>MEN</b>	<b>MEN</b>	<b>OA</b>	<b>OA</b>
<b>OA</b>	<b>EA</b>	<b>OA</b>	<b>MOEA</b>	<b>MOEA</b>
<i>RPA2</i>	<i>POLD1</i>	<i>XRCC1</i>	<i>POLQ</i>	<i>UBE2N</i>
<i>RPA1</i>	<i>LIG1</i>	<i>LIG3</i>		
<i>RPA3</i>	<i>HMGB1</i>			

## 7 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

### 7.1 Βιοδείκτες για την ανάδειξη της προέλευσης βλαβών DNA

#### 7.1.1 Χρήση εργαλείων μετα-ανάλυσης για την εύρεση υπαρκτών και νέων βιοδεικτών βλάβης DNA

Πραγματοποιήθηκε μία μετα-ανάλυση, με χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής ώστε να αλιευτούν από τη βιβλιογραφία τα γονίδια εκείνα των οποίων οι κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες μπορούν να φέρουν πληροφορία για την προέλευση των βλαβών DNA. Θεωρήσαμε τρεις κατηγορίες για τις οποίες ψάξαμε: α) τα πιο συχνά αναφερθέντα γονίδια για αυτές τις κατηγορίες και β) τα γονίδια για την αποκλειστική ανίχνευση της προέλευσης που αποτελούν και την πρότασή μας για μελλοντική ανάπτυξη τέτοιων βιοδεικτών.

Βασιζόμενοι αποκλειστικά σε ήδη δημοσιευμένα δεδομένα, παρουσιάζουμε προτάσεις για πιθανούς βιοδείκτες προέλευσης βλαβών DNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε δύο πίνακες. Θεωρήσαμε τις ακόλουθες τρεις κύριες κατηγορίες σαν αίτια της βλάβης του DNA: α) έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες, β) ύπαρξη οξειδωτικού στρες και γ) στρες αντιγραφής (replication stress). Στον **Πίνακα 7-1** παρουσιάζονται εκείνα τα γονίδια τα οποία στη βιβλιογραφία εμφανίζονται συχνότερα να συσχετίζονται με κάθε μία από τις τρεις προαναφερθείσες κατηγορίες. Στον **Πίνακα 7-2** παρουσιάζονται τα γονίδια του DDR (DNA damage response) μαζί με γονίδια επιδιόρθωσης (DNA repair) των οποίων τα προϊόντα προτείνονται ως δυνητικοί «αποκλειστικοί» βιοδείκτες για την ανίχνευση καθενός από τα τρία είδη στρες. Η χρήση, λοιπόν, των γονιδίων που αναφέρονται στον **Πίνακα 7-2** στοχεύει στην αναγνώριση της αιτίας των βλαβών DNA μέσω της απόκρισης στη βλάβη που εκκινήθηκε.

Επομένως, τα γονίδια που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-1** ενδέχεται να συμμετέχουν σε περισσότερα του ενός DDR μονοπάτια ή σε περισσότερες της μιας αιτίες που προξένησαν τη βλάβη στο DNA, σε αντίθεση με τα γονίδια του **Πίνακα 7-2** όπου κάθε γονίδιο έχει καταχωρισθεί στην κάθε κατηγορία με σχετική βεβαιότητα. Η χρήση των γονιδίων του **Πίνακα 7-1** αποτελεί μια γενική πρόταση γονιδίων για την επιβεβαίωση αλλά και για την ποσοτικοποίηση της έκθεσης, όταν το είδος της έκθεσης είναι γνωστό, ενώ ο **Πίνακας 7-2** φιλοδοξεί να ανιχνεύει το είδος της έκθεσης. Για να προσδιοριστούν τα γονίδια που αποτελούν τους δύο πίνακες εκτελέστηκαν δύο ανεξάρτητες μεθοδολογίες αλίευσης.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα GLAD4U (Gene List Automatically Derived For You) [209], η οποία είναι ένα εργαλείο που «αλιεύει» γονίδια από τα δημοσιευμένα άρθρα στο PubMed<sup>29</sup>, του NCBI<sup>30</sup>. Η GLAD4U αφού συλλέξει το σχετικά με το λήμμα άρθρα, μέσω ενός αλγορίθμου, αλιεύει τα πιο σχετικά γονίδια που αφορούν στο λήμμα που ζητήθηκε από τον χρήστη, και για κάθε γονίδιο παρέχει και κάποιο σκορ, το οποίο εκφράζει το βαθμό συσχέτισης του κάθε γονιδίου με το λήμμα που ζητήθηκε.

Πίνακας 7-1: Γονίδια που απαντώνται συχνότερα στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της έκθεσης σε ιοντιζουσα ακτινοβολία, το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες και της ύπαρξης στρες αντιγραφής.

Ιοντιζουσα ακτινοβολία			Οξειδωτικό στρες	Στρες αντιγραφής
Σκορ γονίδιο	σκορ γονίδιο	σκορ γονίδιο	σκορ γονίδιο	σκορ γονίδιο
194.8 ATM	31.8 ERCC5	15.5 RAD9A	127.8 OGG1	113.6 ATR
87.5 DDB2	29.9 XRCC6	14.5 FANCD2	43.7 APEX1	48.3 CHEK1
79.3 TP53	29.9 TP53BP1	14.4 RNF8	29.2 SOD2	42.5 ATM
73.5 H2AFX	29.4 ERCC2	14.2 RAD51B	28.1 PARP1	32.4 CLSPN
71.7 NBN	29.0 XRCC3	14.2 CDKN1A	27.3 ATM	29.0 ATRIP
71.2 PRKDC	29.0 XRCC5	13.8 BARD1	23.7 GSTM1	23.8 RPA1
56.5 ATR	27.3 XRCC4	13.6 NTHL1	23.3 XRCC1	20.8 RPA2
55.2 CHEK2	23.5 APEX1	13.6 CDC25C	18.7 CAT	17.0 H2AFX
54.6 MRE11A	22.8 DCLRE1C	13.4 XRCC2	18.5 GSTT1	15.6 SMARCAL1
53.8 BRCA1	22.1 RAD18	13.3 NHEJ1	17.9 GPX1	14.3 BLM
52.8 XRCC1	21.1 OGG1	13.3 BRCA2	17.0 ERCC6	14.0 RAD17
52.7 CHEK1	19.5 CDC25A	13.0 ATRIP	16.8 NFE2L2	13.7 WRN
52.3 RAD51	19.5 RAD52	12.8 ERCC1	15.7 ERCC2	11.4 CDC25A
51.1 XPA	19.1 ERCC8	12.5 LIG4	13.9 NUDT1	10.5 RAD9A
50.3 DDB1	18.4 ERCC4	12.0 POLD1	12.5 NEIL1	10.3 FANCM
47.1 PCNA	18.2 CUL4A	11.8 PNKP	11.4 WRN	10.3 NBN
44.9 XPC	17.9 ERCC3	11.5 KAT5	11.0 MUTYH	
39.8 ERCC6	16.7 UIMC1	11.4 MDM2	10.8 TP53	
39.6 RAD50	16.5 RPA1	10.4 PPM1D		
37.6 MDC1	16.4 PARP1	10.2 ABL1		
32.2 POLH	16.0 RPA2			

Συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό των γονιδίων του DDR που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες εισήχθησαν τα λήμματα “oxidative stress and DNA repair”, “DNA repair

<sup>29</sup> **PubMed:** μηχανή αναζήτησης που ανατρέχει κυρίως τη βάση δεδομένων MEDLINE για αναφορές και περιλήψεις άρθρων.

<sup>30</sup> **NCBI:** National Center of Biotechnology Information, μια (υπερ-) βάση δεδομένων που εντάσσεται στο National Institutes of Health των ΗΠΑ.



and oxidative stress” και “oxidative stress and DDR”. Κρατήσαμε μόνο τα γονίδια εκείνα που είχαν σκορ μεγαλύτερο από 10, όπως προέκυπτε από την GLAD4U. Το σκορ ορίζεται ως τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο της τιμής “p” της υπεργεωμετρικής κατανομής. Αντίστοιχα για τα άλλα δύο είχαμε τα ακόλουθα λήμματα: “ionizing radiation and DNA repair”, “DNA repair and ionizing radiation” και “ionizing radiation and DDR”, “replication stress and DNA repair”, “DNA repair and replication stress” και “replication stress and DDR”. Ειδικότερα για το στρες αντιγραφής χρησιμοποιήθηκε και η βιβλιοθήκη PANTHER [210]. Παρατίθενται τα αποτελέσματα στον **Πίνακα 7-1**.

*Πίνακας 7-2: Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA που μπορούν να αξιοποιηθούν για τον εντοπισμό της έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, ύπαρξη οξειδωτικού στρες ή της του στρες που προκαλείται κατά την αντιγραφή του DNA.*

<b>Response to ionizing radiation</b>	<b>Response to oxidative stress</b>	<b>DNA replication stress</b>
<i>FAM175A</i>	<i>PSEN1</i>	<i>POLE3</i>
<i>BRE</i>		<i>RECQL5</i>
<i>BABAM1</i>		<i>IGHMBP2</i>
<i>UIMC1</i>		<i>POLG2</i>
<i>NABP2</i>		<i>RFC2</i>
<i>NABP1</i>		<i>RFC4</i>
<i>EYA3</i>		<i>RFC3</i>
<i>EYA1</i>		<i>RFC5</i>
<i>BRCC3</i>		<i>RFA1</i>
<i>INIP</i>		<i>RFA3</i>
<i>INTS3</i>		<i>RFA2</i>
<i>RNF8</i>		<i>INO80E</i>
<i>RNF168</i>		<i>RNASEH2A</i>
<i>C10orf90</i>		<i>ATR</i>
<i>RFWD3</i>		<i>RBM14</i>
<i>AEN</i>		<i>CDK2</i>
<i>USP28</i>		
<i>BRSK1</i>		
<i>PAXIP1</i>		

Στο **Παράρτημα Γ1** της διατριβής υπάρχουν περισσότερες λεπτομέρειες για την παρούσα ανάλυση.

Για τον προσδιορισμό των γονιδίων που αποτελούν την πρότασή μας ως βιοδείκτες για την αποκλειστική ανίχνευση της αιτίας του στρες του DNA, εκτός από την προηγούμενη ανάλυση, πραγματοποιήθηκε και η ακόλουθη.

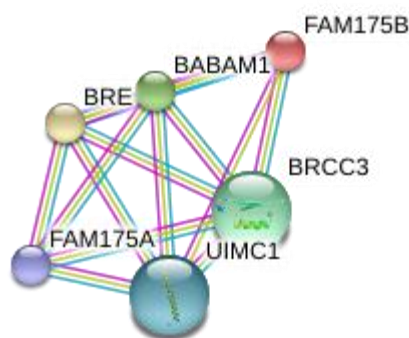
Χρησιμοποιώντας το εργαλείο *AmiGO2* της μηχανής αναζήτησης *Gene Ontology Consortium* [205] θέτοντας τα κατάλληλα φίλτρα προσδιορίσαμε επιπλέον γονίδια σχετικά με το ερώτημα. Τα γονίδια που προέκυψαν ελέγχθηκαν με το εργαλείο *BioVenn* [211] σε όλους τους συνδυασμούς με τις άλλες δυο κατηγορίες και επίσης με τα αντίστοιχα γονίδια που προέκυψαν από την προηγούμενη ανάλυση με το *GLAD4U* και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-1**. Για τη δημιουργία του **Πίνακα 7-2** κρατήσαμε μόνο τα μοναδικά γονίδια για την κάθε κατηγορία.

### 7.1.2 *Επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μετα-ανάλυσης με ξεχωριστή, μη τοποποιημένη αναζήτηση (manual searching)*

Για να ενισχυθεί η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-2**, έγιναν επιπλέον έλεγχοι χρησιμοποιώντας και άλλες μηχανές αναζήτησης σε βάσεις δεδομένων όπως το *Quertle* [212], το *GeneCards* [213], το *Uniprot* [214], το *EntrezGene* [215] και το *PANTHER* [216, 217]. Ελέγχθηκαν στο *Quertle* ένα προς ένα τα γονίδια της κάθε στήλης του **Πίνακα 7-2**, για πιθανούς συσχετισμούς με τις άλλες δύο κατηγορίες, για παράδειγμα, τα γονίδια της πρώτης στήλης ελέγχθηκαν σε συνδυασμό με τους όρους «oxidative stress» και κατόπιν «replication stress». Αντίστοιχοι έλεγχοι έγιναν και για τα υπόλοιπα γονίδια. Ο έλεγχος αυτός δεν έδειξε καμία αλληλοκάλυψη μεταξύ των γονιδίων της κάθε κατηγορίας. Επομένως ο έλεγχος αυτός ισχυροποίησε την έννοια της «μοναδικότητας» των βιοδεικτών αυτών. Ψάχνοντας στις βάσεις δεδομένων που μόλις αναφέρθηκαν συγκεντρώσαμε πληροφορίες για τα γονίδια που αλιεύσαμε με την προηγούμενη ανάλυση.

### 7.1.3 Βιοδείκτες της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία

**FAM175A**<sup>31</sup>, **BRE**<sup>32</sup>, **BRCC3**<sup>33</sup>, **BABAM1**<sup>34</sup> και **UIMC1**<sup>35</sup>: Βρίσκονται όλα σε διαφορετικά χρωμοσώματα, τα προϊόντα τους όμως, δηλαδή οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν ανήκουν στο σύμπλοκο BRCA1A που μετέχει στην επιδιόρθωση των ΔΚΘ. Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζει ειδικά τις ιστόνες H2A και H2AX που έχουν υποστεί ουβικιτίνωση, με την ουβικιτίνη να είναι συνδεδεμένη με τις ιστόνες μέσω της Lys-63. Οι ουβικιτινωμένες αυτές ιστόνες βρίσκονται στην περιοχή της βλάβης DNA, και η αναγνώρισή τους από το σύμπλοκο BRCA1A οδηγεί στη στόχευση του ετεροδιμερούς BRCA1<sup>36</sup>-BARD1<sup>37</sup> στην περιοχή της ΔΚΘ. Το ετεροδιμερές αυτό με τη σειρά του συντονίζει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών οδών, μεταξύ των οποίων και η επισκευή των ΔΚΘ. Το σύμπλοκο BRCA1A συμμετέχει και στο σημείο ελέγχου G2 του DNA, και ειδικώς έχει βρεθεί στην απόκριση στις ακτίνες-Χ.



**NABP1**<sup>38</sup> και **NABP2**<sup>39</sup>: Είναι συστατικά του συμπλόκου SOSS<sup>40</sup>, ενός πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο δρα μετά από το σύμπλοκο MRN<sup>41</sup>, προάγοντας την επιδιόρθωση DNA και το σημείο ελέγχου G2/M. Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών εντός του συμπλόκου

<sup>31</sup> **FAM175A**: Family With Sequence Similarity 175 Member A [218]

<sup>32</sup> **BRE**: Brain And Reproductive Organ-Expressed [219]

<sup>33</sup> **BRCC3**: BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3 [220]

<sup>34</sup> **BABAM1**: BRISC And BRCA1 A Complex Member 1 [221]

<sup>35</sup> **UIMC1**: Ubiquitin Interaction Motif Containing 1 [222]

<sup>36</sup> **BRCA1**: Breast Cancer 1 [223]

<sup>37</sup> **BARD1**: BRCA1 Associated RING Domain 1 [224]

<sup>38</sup> **NABP1**: Nucleic Acid Binding Protein 1 [225]

<sup>39</sup> **NABP2**: Nucleic Acid Binding Protein 2 [226]

<sup>40</sup> **σύνπλοκο SOSS**: sensor of ssDNA, αποτελείται από τις πρωτεΐνες SNU13, NBN, PPP2CA, IGBP1, INTS3, NABP1, NABP2, INIP.

<sup>41</sup> **σύνπλοκο MRN**: αποτελείται από τις πρωτεΐνες MRE11-RAD50-NBN. Συμμετέχει στην επιδιόρθωση των ΔΚΘ, στον ανασυνδυασμό του DNA, στη διατήρηση της ακεραιότητας των τελομερών, στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και στη μείωση [227].

SOSS είναι να δρουν ως αισθητήρες των μονόκλωνων άκρων του DNA και να προσδένονται σε αυτά και ιδιαίτερος στις πολυποριμιδίνες. Το σύμπλοκο SOSS συνδέεται με τις βλάβες του DNA και επηρεάζει ποικίλες αποκρίσεις στις βλάβες, όπως η ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση με χρήση ανασυνδυασμού (recombinational repair) και τη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας. Απαιτείται για τη λειτουργία του Ομόλογου Ανασυνδυασμού και για τα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα εξαρτώμενα από την πρωτεΐνη ATM<sup>42</sup> [213].

#### 7.1.4 Βιοδείκτης της έκθεσης σε οξειδωτικό στρες

**PSEN1:** Έκπληξη προκαλεί η παρουσία ενός μόνο γονιδίου για την ανίχνευση οξειδωτικού στρες. Από τα διαδοχικά φιλτραρίσματα παρέμεινε μόνο το *PSEN1* ως προτεινόμενος αποκλειστικός βιοδείκτης για την ανίχνευση του οξειδωτικού στρες. Αυτό ερμηνεύεται από τον κυρίαρχο ρόλο που έχει το οξειδωτικό στρες στις επιπτώσεις της εκθέσεως σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Το γονίδιο *PSEN1*<sup>43</sup> ανήκει στην επιδιόρθωση του DNA και ειδικά στη βλάβη που προκαλείται από επαγωγείς του οξειδωτικού στρες, όπως την υποξεία [228]. Η κωδικοποιούμενη από το γονίδιο αυτό πρωτεΐνη ανήκει στο σύμπλοκο της εκκριτάσης -γ (gamma secretase complex), το οποίο είναι ένα συστατικό του κυττάρου. Η εκκριτάση -γ είναι εκκαθαριστής διάφορων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και του υποδοχέα Notch και της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς (beta-amyloid precursor protein). Η Presenilin συμμετέχει και στις μεταβολικές διεργασίες, έχοντας οξειδοαναγωγική δράση. Η *PSEN1* αλληλεπιδρά επιλεκτικά και μη-ομοιοπολικά με το Οξυγόνο. Η διερεύνηση μέσω του Quertle [212], το οποίο παρέχει συσχετισμένα αποτελέσματα (text mining) δεν έφερε κάποιο αποτέλεσμα που να συσχετίζει τη δράση αυτής της πρωτεΐνης με την ιοντίζουσα ακτινοβολία ή το στρες που προκαλείται κατά την αντιγραφή του DNA. Συνοψίζοντας, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *PSEN1* σχετίζεται με τη μεταγωγή σήματος, σε απόκριση στις βλάβες DNA και με την ενεργοποίηση της MAPKK<sup>44</sup>.

---

<sup>42</sup> **ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό είναι πολύ σημαντική για την επιδιόρθωση των βλαβών DNA, συμμετέχει στους μηχανισμούς HR και NHEJ των ΔΚΘ.

<sup>43</sup> **PSEN1:** Presenilin 1: μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου σχετίζονται με τη νόσο του Alzheimer. [216]

<sup>44</sup> **MAPKK:** mitogen-activated protein kinase kinase

### 7.1.5 Βιοδείκτες του στρες από την αντιγραφή του DNA

Η **POLE3** είναι μία ιστόνη πακεταρισμένη σε νουκλεοσώματα (a histone-fold protein) που αλληλεπιδρά με άλλες ιστόνες πακεταρισμένες σε νουκλεοσώματα ώστε να προσδένει το DNA με τρόπο μη εξαρτώμενο από την αλληλουχία του (a sequence-independent manner). Αυτά τα διμερή από πακεταρισμένες ιστόνες συνδυάζονται σε μεγαλύτερα ενζυματικά σύμπλοκα ώστε να επιτευχθούν η μεταγραφή, η αντιγραφή και το πακετάρισμα του DNA [215].

Το **RECQL5** είναι ένα γονίδιο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA, και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιεί συνεισφέρουν στην αντιγραφή του DNA ξετυλίγοντας τη διπλή έλικα. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιεί είναι απαραίτητες για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη Μίτωση, όπου συμβαίνουν στάδια που διασταυρώνονται οι αλυσίδες. Είναι επίσης απαραίτητες για την αποτελεσματική επιδιόρθωση του DNA, συμπεριλαμβανομένης και της επιδιόρθωσης των διασταυρώσεων που συμβαίνουν μέσα στην ίδια διπλή έλικα. Προλαμβάνουν τις ανταλλαγές μεταξύ των αδελφών χρωματίδων [214].

Το γονίδιο **IGHMBP2** κωδικοποιεί μία ελικάση η οποία προσδένεται επιλεκτικά στην αλληλουχία DNA στην περιοχή της αιμοσφαιρίνης mu chain switch [215]. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη είναι μία ελικάση 5'-3' η οποία ξετυλίγει το δίκλωνο RNA και το δίκλωνο DNA, σε μία αντίδραση που εξαρτάται από την ATP [214].

Το γονίδιο **POLG2** κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει και στην επιδιόρθωση αλλά και στην αντιγραφή του DNA [214]. Αυτή η πρωτεΐνη ενισχύει την πρόσδεση στο DNA και προάγει τη σύνθεση [215].

Τα γονίδια **RFC2**, **RFC3**, **RFC4** και **RFC5** όλα μαζί κωδικοποιούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο (αποτελούμενο από 5 πρωτεΐνες) που έχει το όνομα RFC (replication factor C). Το σύμπλοκο αυτό έχει το ρόλο σφιγκτήρα φόρτωσης, καταλύοντας τη φόρτωση της PCNA στο DNA. Προσδένεται στο άκρο-3' του DNA και χρησιμοποιεί την ATP ώστε να μπορεί να ανοίξει το δακτύλιο της PCNA και εκείνη με τη σειρά της να κυκλώσει το DNA [215].

Τα γονίδια *RFA1*, *RFA2* και *RFA3* έχουν ουσιαστικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες στο μεταβολισμό του DNA συμπεριλαμβανομένων των αντιγραφή, ανασυνδυασμός και επιδιόρθωση του DNA. Προσδένονται στα μονόκλινα τμήματα DNA σταθεροποιώντας τα καθώς εμποδίζουν την επανασύνδεση μέσω της συμπληρωματικότητας [214].

## 7.2 Γονίδια φυτών ως βιοδείκτες για την ανίχνευση έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Στην ενότητα αυτή αναζητήσαμε πιθανά γονίδια φυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, βάσει της διαφορικής τους έκφρασης, της έκθεσης σε ακτινοβολία. Η χρησιμότητα μιας τέτοιας μελέτης έγκειται στην αφθονία των φυτών στη φύση και επομένως κάποιου ακραίου φαινομένου οι επιπτώσεις, όπως για παράδειγμα η αστοχία κάποιου πυρηνικού σταθμού, θα μπορούσε να μετρηθεί μέσω των αλλαγών που θα συμβούν στα φυτά που βρίσκονται εκεί κοντά. Επομένως στην παράγραφο αξιοποιώντας εργαλεία Βιοπληροφορικής προτείνονται γονίδια φυτών που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως αποκλειστικοί βιοδείκτες για την έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ιοντίζουσα ή μη. Η μελέτη αυτή είναι βεβαίως προκαταρκτική, για να αξιοποιηθεί περαιτέρω, θα πρέπει επίσης να ελεγχθούν τα αποτελέσματά μας με μετα-ανάλυση μικροσυστοιχιών και στη συνέχεια να ακολουθήσει το πείραμα που θα τα βεβαιώσει. Επομένως η αξία της παρούσας ανάλυσης είναι να δώσει κατευθύνσεις για την περαιτέρω μελέτη, μέχρι την τελική υλοποίηση του βιολογικού δοσίμετρου.

Ακολουθεί, λοιπόν, η περιγραφή των σταδίων που εκτελέστηκαν στην παρούσα μελέτη.

1. Αρχικά προσδιορίστηκαν οι όροι γονιδιακής οντολογίας για το κάθε είδος έκθεσης (ιοντίζουσα ακτινοβολία, ακτίνες  $\gamma$ ,  $\alpha$ , UV, UV-A, UV-B, UV-C).
2. Στη συνέχεια για τον κάθε όρο γονιδιακής οντολογίας βρέθηκαν για τα 39 διαθέσιμα (από τη βάση *Ensembl Plants*) φυτά τα γονίδια που χαρακτηρίζονται κάτω από τον κάθε όρο. (7 ΟΓΟ x 39 φυτά = 273 λίστες με γονίδια). Για την ακρίβεια για τα 38 φυτά βρέθηκαν τα γονίδια που είναι ορθόλογα με τα γονίδια του φυτού *Arabidopsis thaliana*, το οποίο θεωρείται φυτό-πρότυπο).
3. Για κάθε έναν από τους 7 όρους γονιδιακής οντολογίας ενοποιήθηκαν οι 39 λίστες του κάθε ενός φυτού, με αποτέλεσμα να καταλήξουμε σε 7 λίστες γονιδίων.
4. Αυτές οι νέες 7 λίστες γονιδίων εισήλθαν σε διάγραμμα Venn, ώστε να διαγραφούν τα κοινά γονίδια. Από τις πιθανές τομές των συνόλων κρατήσαμε αυτές που περιείχαν αποκλειστικά μη κοινά γονίδια.
5. Επειδή και σε αυτό το σημείο τα γονίδια ήταν πολλά, έγινε διαλογή μέσω της εισαγωγής των γονιδίων σε μία βάση δεδομένων που κατασκευάζει PPI-networks<sup>45</sup>. Κρατήσαμε τα

---

<sup>45</sup> **PPI networks**: Protein-Protein Interaction networks: δίκτυα αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών.

γονίδια εκείνα τα οποία ήταν κόμβοι πυκνής διασύνδεσης, ως περισσότερο σημαντικά, διότι φάνηκαν ότι αλληλεπιδρούν με πολλά από τα γονίδια της ομάδας τους.

6. Η τελική αξιολόγηση έγινε κατατάσσοντας τα γονίδια της κάθε κατηγορίας, ως προς το πλήθος των φυτών που εμφάνισαν (ως ορθόλογο στο *A. thaliana*) το ίδιο γονίδιο.

### 7.2.1 Προσδιορισμός των όρων γονιδιακής οντολογίας

Το ερώτημα στη συγκεκριμένη ενότητα είναι η εύρεση γονιδίων τα προϊόντα των οποίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποκλειστικοί βιοδείκτες για την ανίχνευση της έκθεσης των φυτών στα διάφορα είδη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός των όρων γονιδιακής οντολογίας έγινε από τη βάση δεδομένων QuickGO, από όπου ξεκινώντας με το γενικό όρο “response to radiation” εντοπίστηκαν όλοι οι όροι που αποτελούν (οντολογικά) τέκνα αυτού του γενικού όρου και στη συνέχεια επελέγησαν οι όροι εκείνοι που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-3** ως οι ελάχιστοι αλλά επαρκείς. Οι επιλεγμένοι αυτοί όροι στο **Σχήμα 7-1** έχουν καταταχθεί σε «δέντρο των προγόνων», με τη βοήθεια της βάσης QuickGO, ώστε να γίνει εμφανής η ιεραρχία τους.

*Πίνακας 7-3: Τελική επιλογή όρων γονιδιακής οντολογίας*

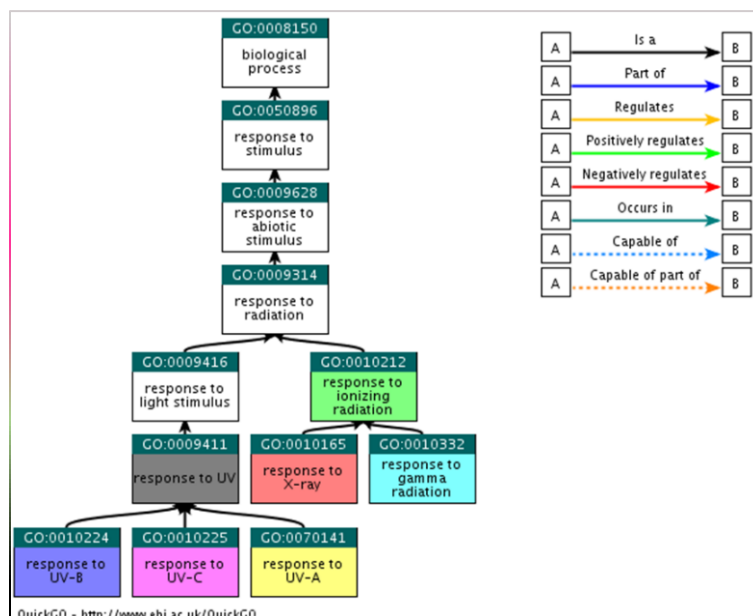
Είδος ακτ/λίας	Annotation	GO term
Ιοντ. ακτινοβολία	response to ionizing radiation	GO:0010212
Ακτίνες -X	response to X-ray	GO:0010165
Ακτίνες -γ	response to gamma radiation	GO:0010332
UV	response to UV	GO:0009411
UV-A	response to UV-A	GO:0070141
UV-B	response to UV-B	GO:0010224
UV-C	response to UV-C	GO:0010225

### 7.2.2 Προσδιορισμός ορθόλογων γονιδίων

Για να γίνει η παρούσα μελέτη όσο το δυνατό πιο περιεκτική, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα διαθέσιμα φυτά που είχε η βάση δεδομένων *Ensembl Plants*. Η βάση αυτή περιέχει πληροφορίες για 39 συνολικά φυτά, μεταξύ αυτών και του *Arabidopsis thaliana* και το οποίο αποτελεί και τον άξονα της παρούσας ανάλυσης, καθώς για τα 38 άλλα φυτά, αντί να προσδιορίσουμε τα ίδια τους τα γονίδια, για κάθε ένα από αυτά που προέκυπτε για τον αντίστοιχο όρο γονιδιακής οντολογίας που χρησιμοποιήθηκε ως φίλτρο για την επιλογή, επιλέξαμε να πάρουμε ως αποτέλεσμα τα ορθόλογα γονίδια του κάθε φυτού στο



*Arabidopsis thaliana*. Στο στάδιο αυτό προέκυψαν 273 λίστες γονιδίων ( 7 όροι γονιδιακής οντολογίας x 39 διαθέσιμα φυτά).



Σχήμα 7-1: Δέντρο των προγόνων για τους επιλεγμένους όρους γονιδιακής οντολογίας του Πίνακα 7-3, όπως δημιουργήθηκε από το QuickGO.

### 7.2.3 Ενοποίηση λιστών

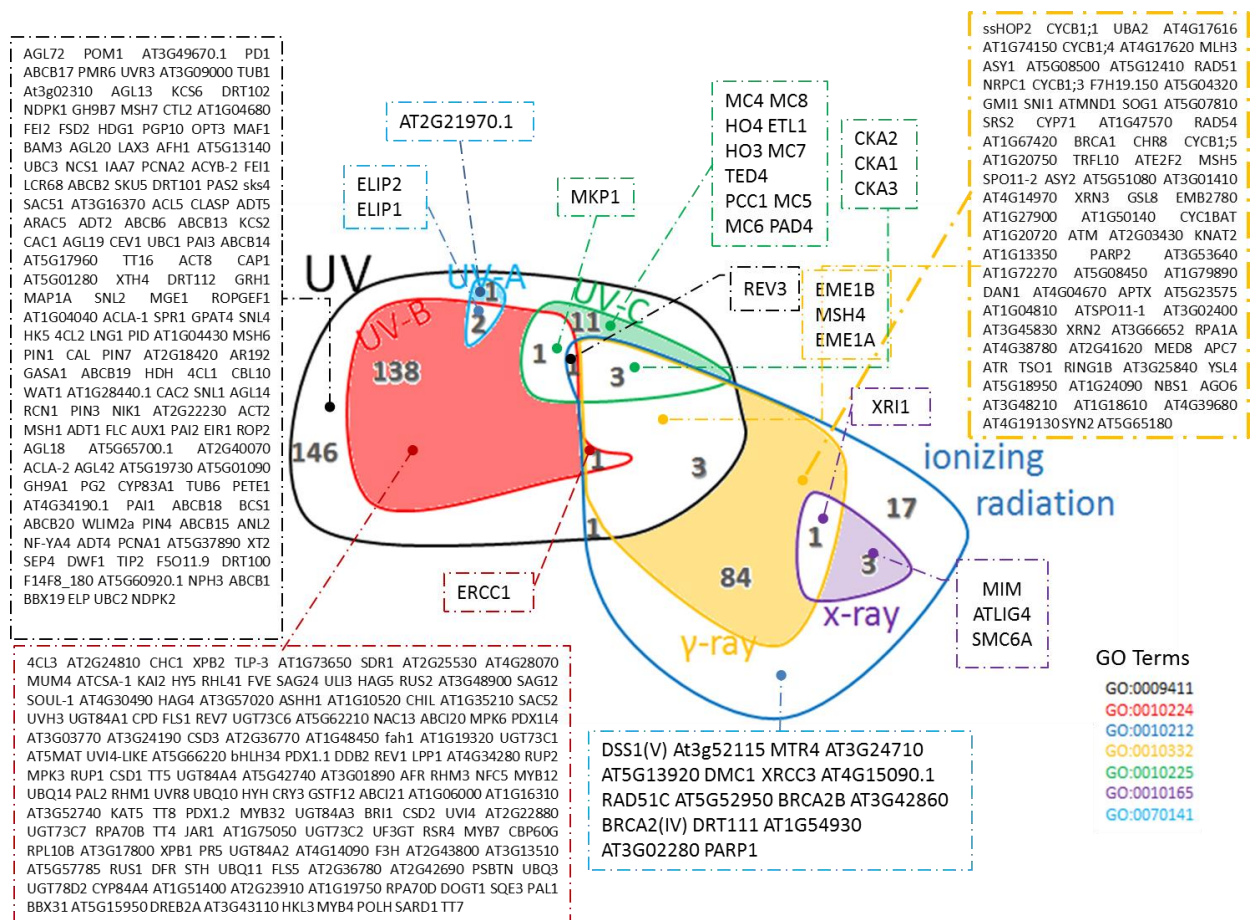
Στη συνέχεια οι 39 λίστες που αντιστοιχούσαν στον κάθε όρο γονιδιακής οντολογίας ενοποιήθηκαν, απαλείφοντας φυσικά τα γονίδια που εμφανίζονταν πολλές φορές, με αποτέλεσμα να μείνουν 7 λίστες, μία για κάθε όρο, οι οποίες συνολικά περιέχουν 410 διαφορετικά γονίδια.

### 7.2.4 Αποκλεισμός κοινών γονιδίων

Οι 7 λίστες, μία για τον κάθε όρο γονιδιακής οντολογίας του Πίνακα 7-3 εισήλθαν σε διάγραμμα Venn, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή DrawVenn [207]. Οι τομές των συνόλων προέκυψαν από το εν λόγω πρόγραμμα, αλλά το ίδιο το διάγραμμα Σχήμα 7-2 σχεδιάστηκε εξ αρχής, καθώς το λογισμικό δίνει τη δυνατότητα σχεδιαστικής αναπαράστασης για διαγράμματα που περιλαμβάνουν έως 5 σύνολα.

## 7.2.5 Επιλογή των πιο λειτουργικών γονιδίων

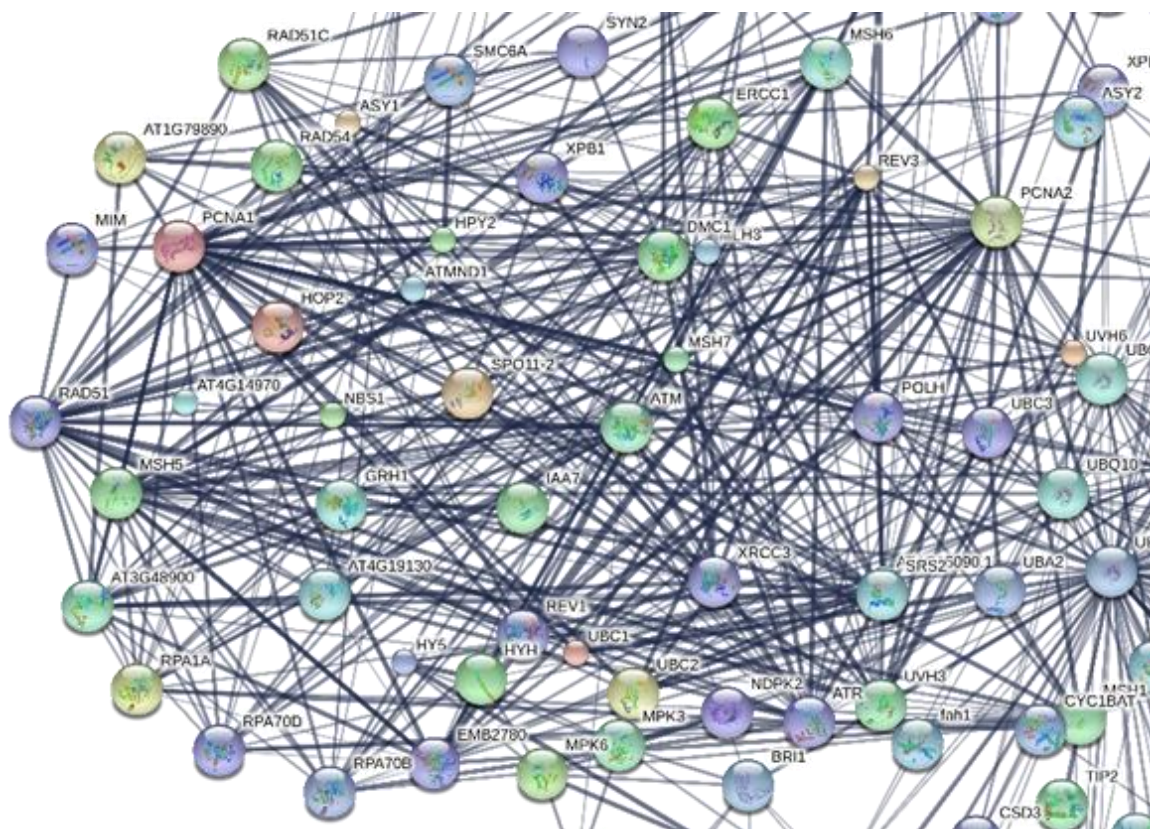
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7-2 τα γονίδια που φαίνεται πως είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν ως αποκλειστικοί βιοδείκτες για την έκθεση στα διάφορα φάσματα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, για κάποιες κατηγορίες, όπως για το UV-B είναι πάρα πολλά. Επομένως για να περιοριστεί το πλήθος τους και να παραχθεί πιο χρήσιμο αποτέλεσμα, έγινε επιπλέον διαλογή, μέσω της ανεύρεσης των πιο λειτουργικών γονιδίων, δηλαδή εκείνων των οποίων τα προϊόντα, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν αλληλεπιδρούν με τις περισσότερες από τις άλλες επιλεγμένες πρωτεΐνες.



Σχήμα 7-2: Πρώτη διαλογή γονιδίων, αποκλείοντας τα κοινά γονίδια μεταξύ των διαφορετικών περιοχών του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Τα επιλεγμένα σύνολα είναι εκείνα που εμφανίζονται στο σχήμα με σκιαγράφιση.

Για το σκοπό αυτόν, δημιουργήθηκε ένα δίκτυο που εμφανίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών για ένα σύνολο επιλεγμένων γονιδίων. Το δίκτυο αυτό δημιουργήθηκε μέσω του STRING V.10.0, ενός εργαλείου που οπτικοποιεί τις αλληλεπιδράσεις, σύμφωνα με το είδος και τη βεβαιότητα της αλληλεπιδράσης [229]. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για το επόμενο στάδιο είναι εκείνα που αποτελούν κόμβους πυκνής σύνδεσης. Στο Σχήμα 7-3

παρουσιάζεται μια λεπτομέρεια του συνολικού δικτύου αλληλεπιδράσεων. Το δίκτυο έχει αναδιαταχθεί ώστε στην άκρη του να ξεχωρίζουν οι πρωτεΐνες που επελέγησαν στο επόμενο στάδιο και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-4**. Για την εμφάνιση του δικτύου επελέγη ως κριτήριο αλληλεπίδρασης η προέλευση των δεδομένων να είναι μόνο από πειραματικά αποτελέσματα. Σαν κριτήριο βεβαιότητας ορίστηκε ο βαθμός 0,4 δηλαδή μια μέση εμπιστοσύνη. Η διαβάθμιση του χρώματος μεταξύ των γραμμών του δικτύου υποδεικνύει τη ισχυρότητα της σχέσης, δηλαδή το σκορύτερο χρώμα δείχνει αυξημένη βεβαιότητα για την αλληλεπίδραση.



Σχήμα 7-3: Λεπτομέρεια από το δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιλεγμένων πρωτεϊνών. Το κριτήριο για την περαιτέρω επιλογή των γονιδίων είναι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν να εμφανίζονται ως κόμβοι πυκνής διασύνδεσης στο συγκεκριμένο δίκτυο. Το δίκτυο αυτό δημιουργήθηκε μέσω της πλατφόρμας STRING V.10.0 [229].

#### 7.2.6 Τελική αξιολόγηση γονιδίων σύμφωνα με την πολλαπλότητα των ορθολόγων

Ως τελικό κριτήριο για να προταθούν γονίδια υποψήφια να αποτελέσουν αποκλειστικούς βιοδείκτες για την έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία τέθηκε η πολλαπλότητα της εμφάνισης των ορθολόγων στο *Arabidopsis thaliana*. Δηλαδή για κάθε ένα από τα γονίδια του προηγούμενου σταδίου αξιολόγησης, που ανήκει σε κάποια από τις 5 κατηγορίες και ανήκει στο *A. thaliana*, μετρήθηκε το πλήθος των φυτών τα οποία εμφανίζονται να έχουν ορθολόγο γονίδιο που να έχει προκύψει μέσω της διαλογής, κάτω από το συγκεκριμένο

όρο γονιδιακής οντολογίας. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ταξινομηθεί και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-4**.

*Πίνακας 7-4: Τελική επιλογή γονιδίων τα προϊόντα των οποίων προτείνονται ως αποκλειστικοί βιοδείκτες για την ανίχνευση σε έκθεση στα διάφορα είδη του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Τα γονίδια έχουν καταταχθεί σύμφωνα με την πολλαπλότητα εμφάνισης ορθόλογων γονιδίων το *A. thaliana* ανά τα διαθέσιμα φυτά του *Ensembl Plants*.*

ακτινες-γ	#	ακτινες-Χ	#	UV-A	#	UV-B	#	UV-C	#
RAD54	30	ATLIG4	28	AT2G21970.1	2	UVH3	32	TED4	3
AT4G14970	30	MIM	7			RPA70B	7	MC4	2
RPA1A	27	SMC6A	6			RPA70D	5	MC7	2
MSH5	23					XPB1	4	MC5	2
RAD51	18					XPB2	4	MC6	2
						AT3G48900	1	MC8	2
								HO4	1
								HO3	1
								ETL1	1
								PCC1	1
								PAD4	1

το σύμβολο ‘#’ δηλώνει την πολλαπλότητα εμφάνισης του κάθε γονιδίου, στο σύνολο των διαθέσιμων φυτών, ως ορθόλογο στο *A. thaliana*

### 7.3 Ανίχνευση κοινών γονιδίων βιοδεικτών βλαβών DNA σε άνθρωπο και φυτά.

Συμπληρωματικά με την προηγούμενη ενότητα, αναζητήθηκαν τα ορθόλογα των επιλεγμένων γονιδίων του **Πίνακα 7-4** στον άνθρωπο και εξετάστηκε εάν αυτά τα γονίδια έχουν επίσης χαρακτηριστεί με κάποιον από τους όρους γονιδιακής οντολογίας του **Πίνακα 7-3**. Η διαδικασία και το αποτέλεσμα αυτής της αντιστοίχισης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-5**. Ενώ για την προηγούμενη ενότητα η εύρεση των ορθολόγων ήταν σχετικά εύκολη εργασία, αφού χρειάστηκε μία μόνο βάση δεδομένων, η αντιστοίχιση μεταξύ των γονιδίων του φυτού *A. thaliana* και του ανθρώπου, που ανήκουν δηλαδή σε διαφορετικά Βασίλεια κατά τη Συστηματική επιστήμη, στο Βασίλειο των Φυτών (Plantae) και των Ζώων (Animalia) αντίστοιχα, είναι κάπως πιο περίπλοκη διαδικασία:

A) Αρχικά για κάθε γονίδιο του **Πίνακα 7-4** προσδιορίστηκε ο κωδικός RefSeq [230] της αντιστοιχης κωδικοποιούμενης από το γονίδιο πρωτεΐνης, και πάλι από τη βάση δεδομένων e!EnsemblPlants [231, 232]. Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζονται στην τέταρτη στήλη του **Πίνακα 7-5**.

B) Εύρεση ομάδων ορθολογίας.

Για κάθε πρωτεΐνη του *A. thaliana* μέσω της βάσης OrthoMCL-DB [233] βρέθηκαν οι ομάδες ορθολογίας στις οποίες εντάσσεται. Οι ομάδες αυτές περιέχουν πρωτεΐνες που προέρχονται από 150 διαφορετικούς οργανισμούς.

Γ) Εύρεση πρωτεϊνών στον *Homo sapiens* που είναι ορθόλογες με τις επιλεγμένες πρωτεΐνες του *A. thaliana*.

Για κάθε μία από τις ομάδες ορθολόγων πρωτεϊνών που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7-5** προσδιορίστηκαν οι πρωτεΐνες που περιέχει και αφορούν τον άνθρωπο (*H. Sapiens*). Η βάση OrthoMCL-DB περιέχει τις πρωτεΐνες για τον άνθρωπο κατά την ονοματολογία ENSP (Ensembl protein ID) [234]. Με αυτήν την ονοματολογία παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες στην έκτη στήλη του πίνακα.

Δ) Αντιστοίχιση της ονοματολογίας των πρωτεϊνών από ENSP σε ονόματα γονιδίων κατά HGNC.

Από τη βάση δεδομένων e!Esembl/biomart επιλέγοντας για τον άνθρωπο (Human genes GRCh38.p7) [235] να εμφανιστεί ολόκληρο το γονιδίωμα, επιλέγοντας τις κατηγορίες Gene ID, HGNC symbol, Protein ID και GO Term Accession εξήχθη ένα αρχείο “.tsv”. Με βάση αυτό το αρχείο έγινε η αντιστοίχιση στην ονοματολογία κατά HUGO [236] και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην προτελευταία (έβδομη) στήλη του **Πίνακα 7-5**.

Πίνακας 7-5: Εύρεση ορθόλογων γονιδίων στον άνθρωπο, για τα γονίδια του *A. thaliana* που προτείνουμε ως αποκλειστικούς βιοδείκτες για την ανίχνευση τε έκθεση στα διάφορα είδη της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

	<i>Arabidopsis thaliana</i>			Ortho Group	<i>Homo sapiens</i>		
	TAIR	Gene Name	RefSeq		ENSP	HGNC	GO
Ακτινές -γ	RAD54	AT3G19210	NP_188552	OG5_127098	ENSP00000336606 ENSP00000396113	RAD54B RAD54L	GO:0010212 GO:0010212
		AT4G14970	NP_193233	OG5_132711	ENSP00000287647	FANCD2	GO:0010332
	RPA1A	AT2G06510	NP_973433	OG5_127539	ENSP00000254719	RPA1	--
	MSH5	AT3G20475	NP_188683	OG5_129379	ENSP00000364894 ENSP00000387668 ENSP00000394619 ENSP00000394649 ENSP00000406868 ENSP00000407047 ENSP00000409207	MSH5 MSH5 MSH5 MSH5 MSH5 MSH5 MSH5	--
	RAD51	AT1G07745	NP_172254	OG5_132909	ENSP00000378090	RAD51D	GO:0010212
Ακτινές -X	ATLIG4	AT5G57160	NP_568851	OG5_130132	ENSP00000402030	LIG4	GO:0010212 GO:0010165 GO:0010332
	MIM	AT5G61460	NP_200954	OG5_127751	ENSP00000370672	SMC6	GO:0010165
	SMC6A	AT5G07660	NP_196383	OG5_127751	ENSP00000370672	SMC6	
UV-A	SEP2	AT2G21970	NP_565524	OG5_178242	no		
UV-B	UVH3	AT3G28030	NP_566830	OG5_128675	ENSP00000347978	ERCC5	GO:0009411 GO:0010225
	RPA70B	AT5G08020	NP_196419	OG5_127539	ENSP00000254719	RPA1	---
	RPA70D	AT5G61000	NP_200908	OG5_127539	ENSP00000254719	RPA1	
	XPB2	AT5G41360	NP_568591	OG5_127208	ENSP00000285398	ERCC3	GO:0009411
	XPB1	AT5G41370	NP_568592	OG5_127208	ENSP00000285398	ERCC3	
	GEN2	AT3G48900	NP_001118 795	OG5_174560	no		
UV-C	TED4	AT2G26670	NP_001118 392	OG5_140322	no		
	MC4	AT1G79340	NP_178052	OG5_147205	no		
	MC8	AT1G16420	NP_173092	OG5_134790	no		
	MC7	AT1G79310	NP_178049	0			
	MC5	AT1G79330	NP_178051	OG5_147205	no		
	MC6	AT1G79320	NP_178050	0			
	HO4	AT1G58300	NP_176126	OG5_140322	no		
	HO3	AT1G69720	NP_177130	OG5_140322	no		
	ETL1	AT2G02090	NP_178318	OG5_129286	ENSP00000351947	SMARCAD1	--
	PCC1	AT3G22231	NP_566702	OG5_144902	no		
PAD4	AT3G52430	NP_190811	OG5_190312	no			

Ε) Έλεγχος των ορθόλογων γονιδίων του ανθρώπου, ως προς τους όρους γονιδιακής οντολογίας του Πίνακα 7-3.

Και πάλι από το αρχείο “.tsv” που εξήχθη στο προηγούμενο βήμα, προσδιορίστηκαν οι όροι γονιδιακής οντολογίας του **Πίνακα 7-3** που περιέχουν τα γονίδια της έβδομης στήλης του **Πίνακα 7-5**. Οι όροι αυτή παρουσιάζονται στην τελευταία στήλη.

Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι στον **Πίνακα 7-5** εμφανίζονται γνωστά γονίδια επιδιόρθωσης DNA, όπως τα γονίδια επιδιόρθωσης ΔΚΘ: RAD54, RAD51, LIG4, όπως και τα γονίδια που συμμετέχουν στον Ομόλογο Ανασυνδυασμό ή την Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (MSH5), ή του Μηχανισμού Εκτομής Νουκλεοτιδίων (ERCC5, ERCC3) και γονίδια του DDR (RPA1). Διαφαίνεται έτσι η συμμετοχή των γονιδίων επιδιόρθωσης στη βελτιστοποίηση της βιοδοσιμετρίας για τις ακτινοβολίες.

## 8 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΦΥΤΑ

Καθώς ο τελευταίος κοινός πρόγονος του ανθρώπου και του φυτού *A. thaliana* χρονολογείται στα 1,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν [237], έχει ενδιαφέρον η σύγκριση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA μεταξύ αυτών των οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικά Βασιλεία της Συστηματικής. Επιλέχθηκε το φυτό *A. thaliana* να εκπροσωπήσει το βασίλειο από το οποίο προέρχεται, καθώς είναι το πιο μελετημένο φυτό. Η σύγκριση που γίνεται εδώ γίνεται μέσω της συσχέτισης των γονιδίων του κάθε οργανισμού, με όρους ορθολογίας. Υπενθυμίζεται στο σημείο αυτό ότι ορθόλογα είναι εκείνα τα ομόλογα γονίδια, όπου διαχωρίστηκαν μέσω της ειδογένεσης. Στην παρούσα παράγραφο τα γονίδια του *A. thaliana* εμφανίζονται με την TAIR [238] ονοματολογία τους, καθώς είναι εκείνη η ονοματολογία που συμφωνεί περισσότερο με την ονοματολογία κατά HUGO [236] (HGNC), η οποία είναι και η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη, όσον αφορά τα γονίδια του ανθρώπου. Και σε αυτήν την αναζήτηση, ο άξονας της μελέτης είναι η αναζήτηση γονιδίων μέσω των όρων γονιδιακής οντολογίας.

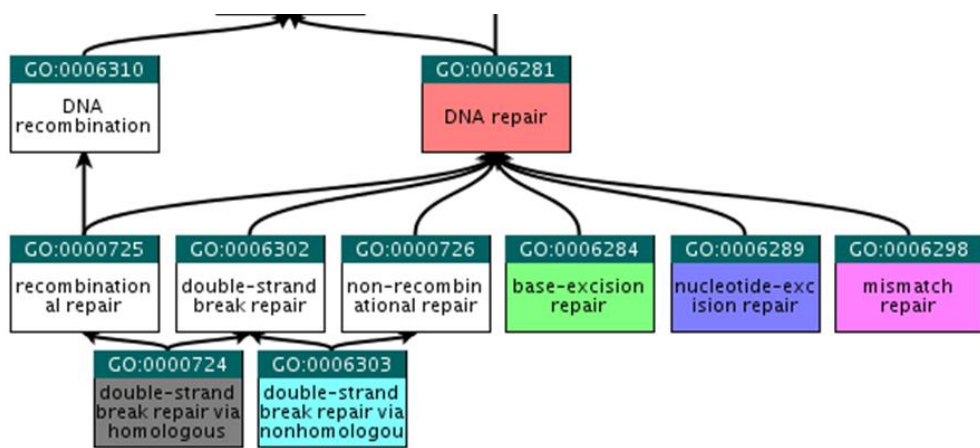
Οι όροι γονιδιακής οντολογίας που εξετάζονται στην παρούσα παράγραφο, έχουν προκύψει με αντίστοιχους τρόπους που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες παραγράφους και δεν επαναλαμβάνονται εδώ, απλώς απαριθμούνται στον **Πίνακα 8-1**.

Στο **Σχήμα 8-1**, παρουσιάζονται οι επιλεγμένοι όροι γονιδιακής οντολογίας σε δέντρο των προγόνων, ώστε να γίνει εμφανής η μεταξύ τους ιεραρχία.

*Πίνακας 8-1: Επιλεγμένοι όροι γονιδιακής οντολογίας για την επιδιόρθωση του DNA σε άνθρωπο και φυτά*

GO term	annotation	Περιγραφή
GO:0006281	DNA repair	επιδιόρθωση DNA
GO:0006284	base-excision repair (BER)	Μηχανισμός εκτομής βάσης (MEB)
GO:0006289	nucleotide-excision repair (NER)	Μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (MEN)
GO:0006298	mismatch repair (MMR)	Επιδιόρθωση αναντιστοιχίας (EA)
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination (HR)	Επιδιόρθωση ΔΚΘ μέσω του Ομόλογου Ανασυνδυασμού (ΟΑ)
GO:0006303	double-strand break repair via nonhomologous end joining (NHEJ)	Επιδιόρθωση ΔΚΘ μέσω της Μη-ομόλογης Ένωσης Άκρων (ΜΟΕΑ)



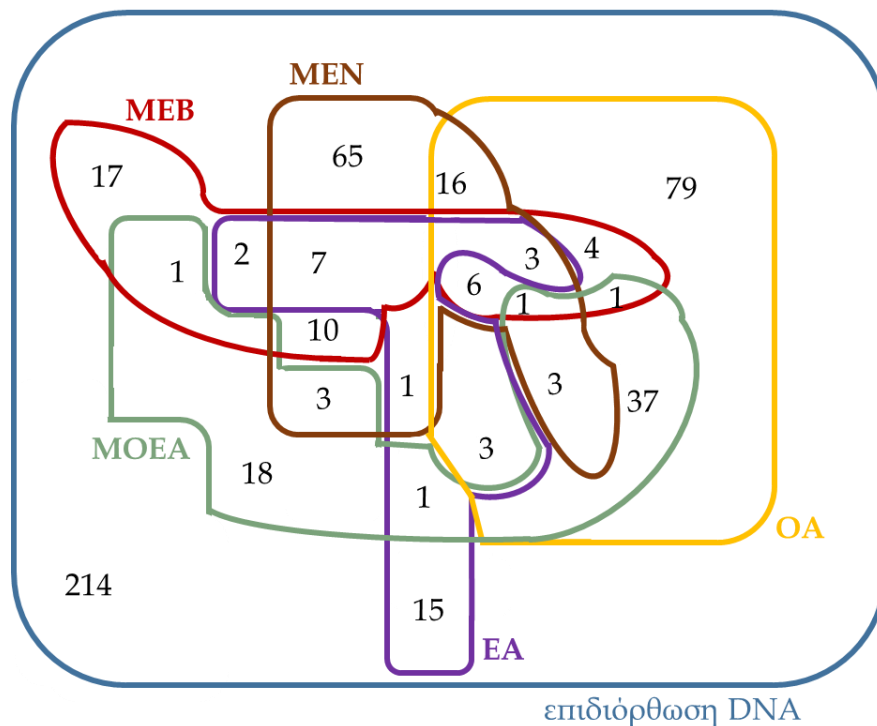


QuickGO - <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

Σχήμα 8-2: Δέντρο των προγόνων για τους επιλεγμένους όρους γονιδιακής οντολογίας που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-1

### 8.1 Γονίδια του *Homo sapiens* που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA

Από τη βάση e!Ensembl> Biomart [235] για κάθε όρο γονιδιακής οντολογίας του Πίνακα 8-1 προσδιορίστηκαν τα γονίδια που περιέχει.



επιδιόρθωση DNA

Σχήμα 8-3: Διάγραμμα Venn για τα ανθρώπινα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA και τους 5 κύριους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Οι όροι γονιδιακής οντολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για να εξαχθούν αυτά τα γονίδια ως αποτέλεσμα, παρουσιάζονται στον Πίνακα VII-12. Τα αρκτικόλεξα επίσης εξηγούνται στον ίδιο πίνακα.

Στο **Σχήμα 8-3** παρουσιάζονται σε διάγραμμα Venn τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Όπως είναι αναμενόμενο και από το **Σχήμα 8-2**, καθώς όλοι οι επιμέρους όροι αποτελούν τέκνα του “DNA repair”, το σύνολο «επιδιόρθωση DNA» περιέχει τα υπόλοιπα σύνολα.

**MEB ∩ MEN ∩ OA ∩ EA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** RPA2 RPA1 RPA3  
**MEB ∩ MEN ∩ OA ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** LIG3  
**MEB ∩ MEN ∩ EA ∩ Επιδιόρθωση DNA:**  
POLD2 PCNA POLD1 POLD3 LIG1 POLD4 HMGB1

**MEB ∩ MEN ∩ OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** RFC2 RFC3 XRCC1 RFC4 RFC5 PARP1  
**MEB ∩ OA ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** POLQ  
**MEN ∩ OA ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** SUMO1 UBE2V2 UBE2N  
**MEB ∩ MEN ∩ Επιδιόρθωση DNA:**  
TP53 PNKP NEIL2 NEIL1 NTHL1 NEIL3 RFC1 OGG1 ERCC6 POLE

**MEB ∩ EA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** TDG MUTYH  
**MEB ∩ OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** SIRT6 DNA2 FEN1 WRN  
**MEB ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** HMGA2  
**MEN ∩ EA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** XPC  
**MEN ∩ OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:**  
HUS1 FAN1 UBB RAD51D ERCC1 BRCA2 ERCC4 RAD52 SUMO2 SLX4 UBE2I HUS1B  
UBA52 RBBP8 RPS27A UBC

**MEN ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** POLL LIG4 PRPF19  
**EA ∩ OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** EXO1 ENSG00000282827 ABL1  
**EA ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** MLH1  
**OA ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:**  
UIMC1 HIST1H4I HIST1H4B NBN HIST4H4 MDC1 HIST1H4J KDM4D BRCC3  
HIST1H4E HIST1H4L HERC2 BRCA1 PIAS4 HIST1H4H BARD1 WHSC1 BABAM1  
HIST3H3 HIST2H4A RNF8 ATM HIST1H4D RNF168 HIST2H4B KAT5 TP53BP1  
HIST1H4A H2AFX HIST1H4C HIST1H4F RAD50 HIST1H4K MRE11A PSMD14  
FAM175A BRE

**MEB ∩ Επιδιόρθωση DNA:**  
PARG CCNO USP47 ENSG00000268361 MBD4 SMUG1 APEX2 PARP2 PRMT6 APEX1  
POLG HMGA1 ENSG00000254469 MPG UNG POLB HUWE1  
**MEN ∩ Επιδιόρθωση DNA:**  
MMS19 SLC30A9 ERCC5 POLR2G COPS6 POLR2L POLK MNAT1 CUL4B DDB1 EP300  
XAB2 BIVM-ERCC5 RPA4 COPS7A COPS2 HMGN1 SUMO3 ZNF830 GTF2H1 COPS5  
RAD23A CETN2 GTF2H2C CUL4A GTF2H5 GPS1 POLR2C DDB2 ATXN3 POLR2K  
SIRT1 RAD23B GTF2H2 PPIE RBX1 POLR2F GTF2H4 ERCC8 POLR2B AQR USP45 USP7  
COPS4 XPA POLR2I COPS8 POLR2J POLR2E ERCC3 GTF2H3 UVSSA CDK7 COPS3  
CHD1L TCEA1 RNF111 POLR2D POLR2H ERCC2 GTF2H2C\_2 CCNH POLR2A ISY1  
COPS7B

**EA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** RNASEH2A MLH3 SETD2 PRKCG MSH3 MSH5-SAPCD1  
MSH5 MSH4 AXIN2 MSH6 PMS1 TREX1 TP73 MSH2 PMS2

**OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:**

YY1 TIPIN ZSWIM7 AP5Z1 RTEL1 KDM1A SMC5 CLSPN RAD1 RMI1 EME1 PPP4R2  
TOPBP1 RHNO1 TOP3A RAD51 RAD51B MMS22L BLM NSMCE2 SLX1B DMC1 XRCC3  
SFPQ GEN1 WDR48 RAD54B TERF2IP PARPBP BRIP1 RAD9B PALB2 SPIDR RAD51C  
SWI5 GINS4 SFR1 MEIOB RNF4 MCM9 FIGNL1 AP5S1 CHEK1 FBXO18 NABP2 TONSL  
MORF4L1 RAD9A INO80 RTEL1-TNFRSF6B ATR ATRIP REC8 MUS81 RAD54L CDC45  
SWSAP1 MCM8 FIGN SLX1A RMI2 POLN SHFM1 TEX15 CCDC155 ZFYVE26 CDC7  
GINS2 NSMCE1 PPP4C CDK2 NABP1 SMC6 TIMELESS RAD21L1 HELQ RAD17  
RAD51AP1 XRCC2

**MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:**

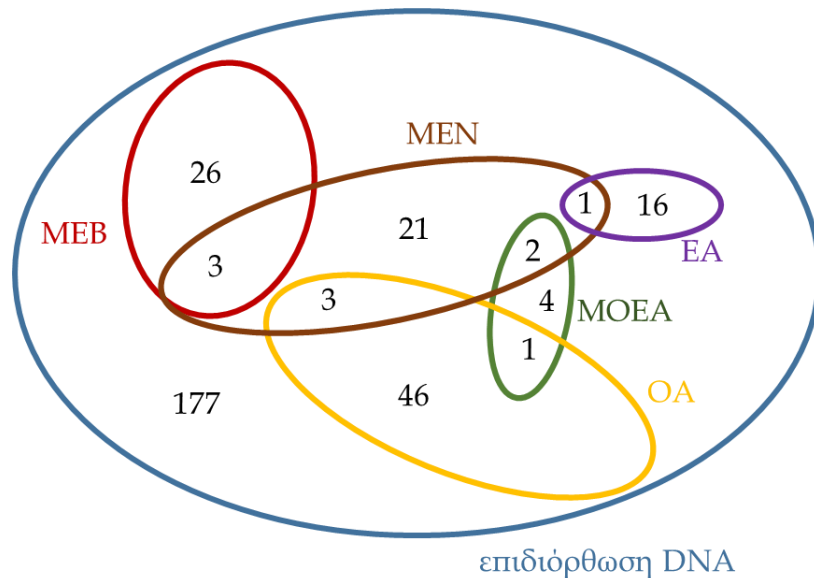
POLA1 PAXIP1 C9orf142 RIF1 UVRAG XRCC4 XRCC5 PRKDC DCLRE1A DEK POLM  
XRCC6 NHEJ1 KDM2A SETMAR XRCC6BP1 DCLRE1B DCLRE1C

**Επιδιόρθωση DNA:**

KDM4A ESCO2 DMAP1 NSMCE3 MTOR BTG2 NPAS2 DDX1 ATRX KIN CDKN2D  
INO80E SLF1 UBR5 SSRP1 GGN IGHMBP2 STUB1 UBE2A HIST3H2A ENSG00000269307  
BACH1 EYA1 CHAF1A FAAP100 DTL TFPT ENDOV OTUB1 MORF4L2 TREX2 RFWD3  
PRIMPOL NSMCE4A NFRKB MEN1 INO80B FANCA EEPD1 HLTf RECQL POLI CIB1  
SMARCA5 PML RPS27L POLG2 BCCIP INIP CSNK1E CDK9 CDC14B MCRS1 NONO  
PARP3 CHAF1B ACTR8 REV3L TAOK3 PPP5C STRA13 ASCC3 TIGAR ACTL6A TTC5  
ALKBH1 TERF2 WDR33 BAZ1B RRM2B HINFP GADD45A RUVBL1 SPATA22 SMC3  
KPNA2 NUDT1 RCHY1 FTO EPC2 EYA4 UBE2F ASCC2 UBE2D3 SMARCAD1 RBM14  
SHPRH RAD21 REV1 UCHL5 EME2 EGFR UBE2U ALKBH2 ZRANB3 KIAA0430 ZBTB1  
PARP4 ASF1A PAPD7 FOXM1 UBE2V1 CEP164 TICRR JMY POLE2 USP43 FANCM  
HSPA1A WRNIP1 UBA7 SETX CDK1 MC1R PIF1 CHRNA4 FANCE SMARCB1 KIF22  
CBX8 DTX3L ASCC1 APTX CDC5L CSNK1D EYA3 BOD1L1 MGME1 EXO5 FBXO6  
RPAIN TNP1 CINP FANCL SPRTN UHRF1 APLF NPM1 MAPK8 KIAA0101 APBB1  
USP10 ALKBH3 RPS3 RAD18 APITD1 CEBPG USP28 SUPT16H FANCI UBE2B PARP9  
TRIP12 RUVBL2 FAAP24 INO80D FANCF TRIM25 TAOK1 UFD1L MGMT MUM1 VCP  
ENSG00000267618 SMG1 ZBTB32 KDM4B TWIST1 SLF2 CHEK2 NUDT16 TDP2 FANCC  
INO80C ERCC6L2 TRRAP SMC1A SYCP1 TRIP13 EID3 NCOA6 MAD2L2 UBE2L6  
PTTG1 USP1 NPLOC4 UPF1 PSME4 EMSY HMGB2 TRIM28 FANCB CDCA5 UBE2T  
TMEM161A RECQL5 UBE2W ACTR5 MTA1 INTS3 USP3 ISG15 FANCG TDP1 EYA2  
RDM1 FGF10 FANCD2 FAAP20 TEX12 ASTE1 POLH RNF169 FZR1

## 8.2 Γονίδια του *Arabidopsis thaliana* που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA

Από τη βάση e!EnsemblPlants [231, 232] για κάθε όρο γονιδιακής οντολογίας του Πίνακα 8-1 προσδιορίστηκαν τα γονίδια που περιέχει.



Σχήμα 8-4 Διάγραμμα Venn με τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA και τους 5 κύριους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, για το φυτό *A. thaliana*. Οι όροι γονιδιακής οντολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για να εξαχθούν αυτά τα γονίδια ως αποτέλεσμα, παρουσιάζονται στον Πίνακα VII-12. Τα αρκτικόλεξα επίσης εξηγούνται στον ίδιο πίνακα.

**MEB ∩ MEN ∩ Επιδιόρθωση DNA:** MRE11 OGG1 FPG1

**EA ∩ MEN ∩ Επιδιόρθωση DNA:** ATRAD4

**MEN ∩ OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** ERCC1 UVH1 AT1G52530

**MEB ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** AT1G10520 LIG4

**OA ∩ MOEA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** ATR

**MEB ∩ Επιδιόρθωση DNA:**

AT1G19480 MYH AT1G80850 AT5G57970 ATUNG NTH2 AT3G50880 AT1G15970 DML3  
MAG AT3G12710 AT3G47830 NTH1 APE2 AT1G75090 AT1G75230 FEN1 AT3G07930  
ARP DML2 DME AT2G10550 APE1L ROS1 AT1G13635 AT5G44680

**MEN ∩ Επιδιόρθωση DNA:**

XPB2 AT1G62886 AT1G18340 AT1G12400 AT4G17020 RAD23C UVH3 UVH6 RAD23A  
DDB1B TFB1-3 ATGTF2H2 RAD23B DDB1A TFB1-1 AT5G16090 PNG1 NRPB9B XPB1  
NRPB9A RAD23D

**EA ∩ Επιδιόρθωση DNA:** MLH3 MSH7 AT1G65070 MSH3 AT3G15960 PCNA PCNA2  
MSH5 MSH4 AT2G25100 AT5G54090 MSH6 PMS1 MLH1 MSH1 MSH2

**OA ∩ Επιδιόρθωση DNA:**

ORC3 SDS SMC5 emb1379 AT3G15550 RMI1 RAD51 RAD51B FAS2 CHR25 SNI1 MMS21  
RECQL4A AT4G33925 XRCC3 BRCA1 RAD5 AT3G27120 BARD1 ATDSS1(V) ASF1A  
FAS1 SLD5 AT2G03430 BRCA2B AT1G59760 AT3G42860 POLD3 ASF1B AT5G47870

DMS3 MUS81 CDC45 MCM8 AT1G71310 AT4G16970 BRCA2A POLA2 SMC6B NBS1  
SMC6A GINS2 AT3G48210 CTF7 TOR XRCC2

**ΜΟΕΑ ∩ Επιδιόρθωση DNA:** KU80 PARP2 XRCC1 KU70

**Επιδιόρθωση DNA:**

AT4G32970 AT5G02370 MED34 CHC1 NSE4B RPA3B DET1 RPA2B AT2G01440  
AT1G51210 ATRX AT2G02550 WHY2 SSRP1 PA200 RPA1B ATCSA-1 POLIA AT5G05670  
GEN2 UVR3 AT5G49110 PHR1 HAM1 ASY1 MAPR4 DRT102 PRP19A AT3G51700 SNM1  
RPS3C ASHH1 REV3 TOP3A RAD51D NET1D AT5G43530 BOLA2 AT2G19490 UEV1A  
DMC1 XRCC4 PARP3 REV7 UBC3 RNR2A RECA3 GEN1 GPAT9 NSE4A AT5G15610  
EXO1 CHR8 AT1G12244 CRY2 DRT101 NAP1;1 TRFL10 EME1B AT1G11240 RPA1E  
HAM2 SMC3 TSO2 AT1G18090 AT1G49250 AT4G14970 UBC1 PRP19B ARP4 DSE1  
AT3G13226 MSI4 OFP1 RAD51C DDB2 BRCC36A REV1 AT5G23910 ALKBH2 ATDTPB2  
ARP4A MND1 AT2G30350 POL2B RPA1D RECQL4B SWI2 AT3G52905 AXR1 XRI1  
AT1G77620 WHY1 RPS3A MCM9 AT5G28780 ETL1 ZDP AT1G05840 AT2G23080 CRY3  
AT4G31150 CML19 AT3G02400 AT1G14340 TTN8 AT1G78790 CUL4 AT3G11100 SPT16  
UBC35 ETG1 RPA1A ATSRP3 RPA2A BRCC36B INO80 RECA AT4G30825 DUF9 CAPH2  
AT5G07400 RFC1 AT3G04620 UEV1C EME1A AT5G50340 TAF14B MER3 AT3G51690  
RPA1C AT1G49980 RAD50 AT5G65740 POLIB LIG1 AT1G61410 UBC28 PHR2 RECQSIM  
CDC5 AT3G12210 RPA3A NAP1;3 DUT AT4G17760 DRT111 SMC4 WHY3 POL2A  
AT3G09100 UEV1B ATSRP2 RAD9 AT1G11780 SWC4 AT1G02160 ARP5 DRT100 COP1  
GR1 CRY1 AT4G32960 NAP1;2 TDP1 MPC1 UBC2 BHLH140 AtLIG6 AT4G30820  
AT3G32920 RAD17 PARP1 SYN2 AT2G43280 RPS3B POLH

### 8.3 Σύγκριση των μηχανισμών επιδιόρθωσης μεταξύ των δύο οργανισμών μέσω της εξεύρεσης ορθολογών γονιδίων

Κάθε μία από τις 12 λίστες γονιδίων επιδιόρθωσης DNA, 6 για τον κάθε οργανισμό, εισήχθη στη βάση OrthoMCL-DB [233]. Αναφέρεται και εδώ ότι η κατάλληλη ονοματολογία για τα γονίδια του ανθρώπου είναι η ονοματολογία που δέχεται η βάση είναι η ENSP των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών από αυτά τα γονίδια, (Ensembl protein ID) [234] και η RefSeq [230] για τα γονίδια του *A. thaliana*. Στον πίνακα όμως που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αντίστοιχα γονίδια με τις ονοματολογίες HGNC [236] και TAIR [238], για τον άνθρωπο και για το φυτό, διότι σύμφωνα με αυτές τα γονίδια είναι περισσότερο αναγνωρίσιμα. Τα αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**. Στο σημείο αυτό παρουσιάζουμε έναν πίνακα (**Πίνακας 8-2**) συνολικά για την επιδιόρθωση του DNA, δηλαδή για τον όρο γονιδιακής οντολογίας GO:0006281.

Ο συνδυασμός των δεδομένων μέσω της βάσης OrthoMCL-DB έδειξε γνωστές ορθολογίες μεταξύ γνωστών γονιδίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, αλλά ανέδειξε επίσης, ακριβώς μέσω της ορθολογίας γνωστά γονίδια σε νέους ρόλους.

Η ανάδειξη γονιδίων σε νέους ρόλους (επιδιόρθωση DNA) εξηγείται μέσω του **Σχήματος 8-5**. Στο σχήμα αυτό θεωρούμε ότι τα γονίδια που βρίσκονται μέσα σε παρενθέσεις,

δηλαδή τα γονίδια '(a)', '(b)', '(d)', '(e)', '(ii)' και '(iii)', είναι γνωστά γονίδια ότι ανήκουν σε κάποιον δεδομένο όρο γονιδιακής οντολογίας. Είναι δηλαδή γονίδια όπως εκείνα που περιέχονται στα **Σχήματα 8-3 & 4**, στα διαγράμματα Venn. Το γονίδιο '(a)' του ανθρώπου βρέθηκε να ανήκει στις ομάδες ορθολογίας 'Α' και 'Β'. Το γονίδιο 'i' ανιχνεύτηκε στην ομάδα 'Α', λόγω της ορθολογίας, χωρίς να όμως να έχει προηγουμένως χαρακτηριστεί ότι ανήκει στον όρο γονιδιακής οντολογίας που εξετάζεται. Η ομάδα ορθολογίας 'Β' περιέχει επίσης το ανθρώπινο γονίδιο '(a)' αλλά και το γονίδιο '(ii)' του *A. thaliana*. Για αυτόν το λόγο, τα ήδη χαρακτηρισμένα ότι ανήκουν στον ΟΓΟ γονίδια έχουν συνδυαστεί ως ορθόλογα. Τέτοιου είδους είναι τα ζεύγη που παρουσιάστηκαν στον **Πίνακα 8-2**.

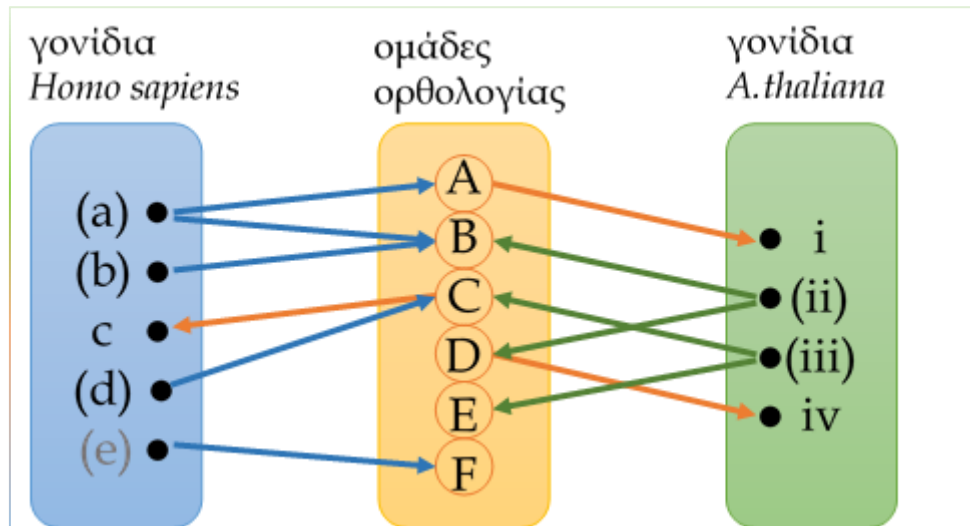
Πίνακας 8-2: Ζεύγη ορθόλογων γονιδίων επιδιόρθωσης DNA για τον άνθρωπο και το φυτό *A. thaliana*. Ο πίνακας αυτός περιέχει αυστηρά μόνον ζεύγη γονιδίων που έχουν ήδη χαρακτηριστεί υπό τον όρο γονιδιακής οντολογίας GO:0006281, και όχι γονίδια που προέκυψαν από τη δική μας ανάλυση.

<i>Homo sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
RECQL	RECQL4A MED34	RAD23B RAD23A	RAD23A	CDC5L	CDC5	DMAP1	SWC4
RECQL5			RAD23B	PMS2	PMS1	MCM8	MCM8
WRN			RAD23C	SUPT16H	SPT16	TDP1	TDP1
BLM			RAD23D	MUTYH	MYH	NSMCE4A	NSE4A
KAT5			PCNA	PRPF19	PRP19A	XRCC6	KU70
TOP3A	HAM2 HAM1	PCNA	PCNA2	POLR2I	NRPB9A NRPB9B	DCLRE1A	SNM1
APEX2	TOP3A	LIG1	LIG1 AT1G49250	ACTL6A	ARP4	GTF2H3	AT1G18340
RPS3	ARP	SSRP1	SSRP1	PNKP	ZDP	SMARCAD1	ETL1
	APE1L	UNG	ATUNG	ATR	ATR	CDC45	CDC45
	APE2	RFC1	RFC1	CHAF1B	FAS2	APTX	BHLH140
RRM2B	RPS3A	FEN1	FEN1	PARP2	PARP1	XRCC5	KU80
	RPS3B	ASF1A	ASF1A ASF1B	PARP1	PARP2	RAD17	RAD17
	RPS3C	EXO1	AT1G18090	GINS2	GINS2	ALKBH1	AT1G11780
RAD51	RNR2A	MSH2	MSH2	POLH	POLH	DDB1	DDB1A DDB1B
DMC1	TSO2	RPA1	RPA1A RPA1B RPA1C RPA1D	XPC	ATRAD4	NSMCE1	emb1379
MSH6	DMC1	ERCC2	UVH6	SLX1A	SLX1B	CHAF1A	FAS1
RNASEH2A	MSH7 MSH6	UBE2V1	UEV1A UEV1B UEV1C	ERCC5	UVH3	RAD9B	RAD9
NTHL1	AT2G25100	GTF2H2	ATGTF2H2	ERCC1	ERCC1	RAD9A	RAD9
UBE2A	NTH2 NTH1	GTF2H2C	MRE11A	SLX1A	SLX1B	GTF2H1	TFB1-1 TFB1-3
UBE2B	UBC1 UBC2 UBC3	MRE11A	MRE11	SLX1B	SLX1B	LIG4	LIG4
MLH1	XPB2 XPB1	ERCC4	UVH1	ERCC6	CHR8	MPG	MAG
ERCC3	TOR	OGG1	OGG1	RPA2	RPA2A RPA2B	SHFM1	ATDSS1(V)
NSMCE2	MMS21	ERCC6L2	SWI2	GTF2H4	AT4G17020	INO80	INO80
BRCA2	BRCA2A BRCA2B	XRCC1	XRCC1	GINS4	SLD5	MSH3	MSH3
POLL	AT1G10520	XRCC2	XRCC2	CUL4A	CUL4	RAD1	AT4G17760
FANCL	AT5G65740	KIF22	AT5G02370	CUL4B	CUL4	POLD3	POLD3
ATRX	ATRX	PSME4	PA200	ZSWIM7	AT4G33925	XRCC3	XRCC3
RAD51B	RAD51B	RAD54L	CHR25	GEN1	GEN1	RAD51C	RAD51C
UBE2D3	UBE28	RAD54B	CHR25	ALKBH3	ALKBH2	DDB2	DDB2
UBE2D2	UBE28	POLE2	ATDPB2	XRCC4	XRCC4	NEIL2	FPG1
MLH3	MLH3	F1GNL1	AT3G27120	FANCI	AT5G49110	MAD2L2	REV7
		MUS81	MUS81	MSH5	MSH5	SMC3	SMC3
				MSH4	MSH4	NBN	NBS1
				SMC1A	ITN8	REV1	REV1
				FANCD2	AT4G14970	ACTR5	ARP5
				ESCO2	CTF7		

Πίνακας 8-3: Γονίδια των 5 βασικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, για τον άνθρωπο (Hs) και το φυτό (At) ομαδοποιημένα σύμφωνα με την ορθολογία. MEB- μηχανισμός εκτομής βάσης, MEN- μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων, EA-επιδιόρθωση αναντιστοιχίας, OA-ομόλογος ανασυνδυασμός, MOEA- μη ομόλογη ένωση άκρων.

MEB		MEN		EA		OA		MOEA	
Hs	At	Hs	At	Hs	At	Hs	At	Hs	At
APEX2	ARP APE1L APE2	ERCC3	XPB2 XPB1	MSH6	MSH7 MSH6	WRN BLM	RECQL4A	PARP2 PARP1	PARP2
NTHL1	NTH2 NTH1	RAD23B RAD23A	RAD23A RAD23B RAD23C RAD23D	RNASEH2A	AT2G25100	RAD51 DMC1	RAD51	XRCC6	KU70
UNG	ATUNG	ERCC2	UVH6	MLH1	MLH1	FIGNL1	AT3G27120	XRCC5	KU80
FEN1	FEN1	GTF2H2 GTF2H2C	ATGTF2H2	PCNA	PCNA PCNA2	RAD54L RAD54B	CHR25	XRCC1	XRCC1
MRE11A	MRE11	POLR2I	NRPB9A NRPB9B	MSH2	MSH2	MTOR	TOR		
OGG1	OGG1	XPC	ATRAD4	PMS2	PMS1	ERCC4	UVH1		
MUTYH	MYH	ERCC5	UVH3	MSH5	MSH5	ATR	ATR		
MPG	MAG	GTF2H4	AT4G17020	MSH4	MSH4	GINS2	GINS2		
NEIL2	FPG1	GTF2H3	AT1G18340	MSH3	MSH3	SMC5	SMC5		
		DDB1	DDB1A DDB1B	MLH3	MLH3	ERCC1	ERCC1		
		GTF2H1	IFB1-1 IFB1-3			GINS4	SLD5		
		LIG4	LIG4			MCM8	MCM8		
		POLL	AT1G10520			MUS81	MUS81		
						CDC45	CDC45		
						NSMCE1	emb1379		
						SHFM1	ATDSS1(V)		
						POLD3	POLD3		
						XRCC3	XRCC3		
						NSMCE2	MMS21		
						BRCA2	BRCA2A BRCA2B		
						NBN	NBS1		
						XRCC2	XRCC2		
						ZSWIM7	AT4G33925		
						RAD51B	RAD51B		





Σχήμα 8-5: Μέθοδος αντιστοίχισης σε ομάδες ορθολογίας και ανάδειξη γονιδίων σε νέους ρόλους. Ξεκινώντας από τα γονίδια που βρίσκονται στις παρενθέσεις, δηλαδή τα γονίδια που ήδη είναι χαρακτηρισμένα ότι ανήκουν σε κάποιον όρο γονιδιακής οντολογίας, μέσω των ομάδων ορθολογίας, αναδεικνύονται τα γονίδια, 'c', 'i' και 'iv', τα οποία είναι μεν γνωστά γονίδια, αλλά δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα κάτω από το συγκεκριμένο όρο. Με αυτόν τον τρόπο, στο παρόν κείμενο προτείνονται πολλά «νέα» γονίδια, ως πολύ πιθανές υποψηφιότητες στο να ανήκουν και αυτά στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA.

Θέτοντας το γονίδιο '(ii)' του *A. thaliana* στο OrthoMCL-DB ως είσοδο, προέκυψε το μη χαρακτηρισμένο μέχρι στιγμής γονίδιο 'iv' του *A. thaliana*. Από την άλλη μεριά, το γονίδιο '(e)' του ανθρώπου, ανήκει στην ομάδα 'F', αλλά καθώς αυτή η ομάδα δεν περιέχει κανένα γονίδιο του *A. thaliana*, τελικά το γονίδιο '(e)' εξαιρέθηκε από τα αποτελέσματα.

#### 8.4 Ανάδειξη «νέων» γονιδίων για τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

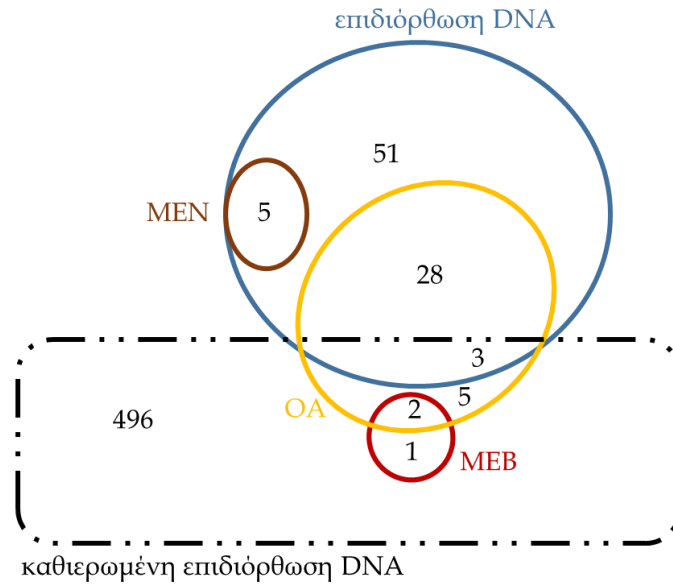
Μέσω της αντιστοίχισης που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 8-5 προέκυψε ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων που δεν είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί ως γονίδια επιδιόρθωσης. Το εύρημα αυτό έχει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς έτσι υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες αυτά τα «νέα» γονίδια όντως να ανήκουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης και να μην είναι ακόμα γνωστά. Αναλυτικά οι πίνακες με τις αντιστοιχίσεις για τον κάθε όρο γονιδιακής οντολογίας δίνονται στο Παράρτημα. Στον Πίνακα 8-4 δίνονται τα ποσοτικά αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης. Παρατηρώντας τις δυο τελευταίες στήλες, για το *A. thaliana* αναδείχθηκαν πολύ περισσότερα «νέα» γονίδια από όσα για τον άνθρωπο. Τούτο πιθανώς συμβαίνει διότι ο άνθρωπος είναι περισσότερο μελετημένος οργανισμός από το *A. thaliana*, με αποτέλεσμα, τα ορθόλογα γονίδια που βρέθηκαν στο φυτό, να

αντιστοιχίζονται σε ήδη χαρακτηρισμένα γονίδια του ανθρώπου, επιτρέποντας έτσι σε εμάς να τα προτείνουμε ως πιθανά για την επιδιόρθωση του DNA του φυτού.

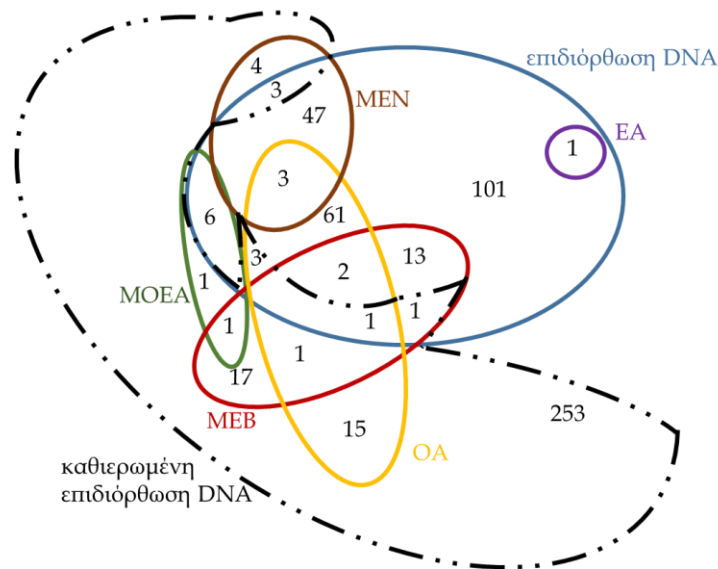
Πίνακας 8-4: Ποσοτικά αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης των μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA για τον άνθρωπο και το φυτό. Στην πρώτη στήλη αναφέρονται οι όροι γονιδιακής οντολογίας που αφορούν την επιδιόρθωση του DNA. Στη δεύτερη στήλη σημειώνεται ο αριθμός των ήδη γνωστών γονιδίων του ανθρώπου (*Homo sapiens*-Hs) που έχουν χαρακτηριστεί με το συγκεκριμένο όρο. Η τρίτη στήλη αναφέρεται σε κείνα από τα γονίδια της δεύτερης στήλης που έχουν ορθόλογο στο *Arabidopsis thaliana* (At). Στην τέταρτη στήλη εκφράζεται αυτή η σχέση σε ποσοστό %. Στις στήλες 5-7 εκφράζονται οι αντιστοιχοί αριθμοί για το *A. thaliana*. Στις δύο τελευταίες στήλες παρουσιάζονται οι αριθμοί των γονιδίων που βρέθηκαν σε νέους ρόλους, δηλαδή να συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και που δεν είχαν μέχρι στιγμής χαρακτηριστεί ως τέτοια. ΜΕΒ, μηχανισμός εκτομής βάσης, ΜΕΝ, μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων, ΕΑ, επιδιόρθωση αναντιστοιχίας, ΟΑ, ομόλογος ανασυνδυασμός και ΜΟΕΑ, μη ομόλογη ένωση άκρων.

1. Μηχανισμός (GO term)	2. # γονιδίων του Hs	3. # γονιδίων του Hs που έχουν ορθόλογο στο At	4. %	5. # γονιδίων του At	6. # γονιδίων του At που έχουν ορθόλογο στον Hs	7. %	8. # προτεινόμενων γονιδίων για τον Hs	9. # προτεινόμενων γονιδίων για το At
Επιδιόρθωση DNA GO:0006281	507	259	51.1	300	185	61.7	86	243
ΜΕΒ GO:0006284	52	32	61.5	29	12	41.4	3	36
ΜΕΝ GO:0006289	124	59	47.6	30	21	70.0	5	57
ΕΑ GO:0006298	43	14	32.6	17	12	70.6	0	1
ΟΑ GO:0000724	162	76	46.9	50	37	74.0	38	87
ΜΟΕΑ GO:0006303	73	9	12.3	7	4	57.1	0	8
Συνολικός αριθμός γονιδίων «νέων» γονιδίων που προτείνονται από την παρούσα μελέτη για την επιδιόρθωση του DNA. (Διαγράμματα Venn Σχήματα VII-10 & 11)							95	281
Αριθμός γονιδίων που προτείνονται από την παρούσα μελέτη, χωρίς προηγουμένως να έχουν χαρακτηριστεί υπό το γενικό όρο 'DNA repair'. (Διαγράμματα Venn Σχήματα VII-10 & 11)							84	234

Στα Σχήματα 8-6 & 8-7 παρουσιάζονται τα νέα γονίδια σε μορφή διαγράμματος Venn. Για τον κάθε οργανισμό παρουσιάζεται επιπλέον η τομή των συνόλων με το σύνολο των γονιδίων (στικτή γραμμή) που ήδη έχουν χαρακτηριστεί κάτω από τον όρο γονιδιακής οντολογίας "DNA repair, GO:0006281". Τα γονίδια που περιέχονται σε αυτά τα διαγράμματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 8-5 & 8-6.



Σχήμα 8-6: Διάγραμμα Venn με τα γονίδια του ανθρώπου που αναδείχθηκαν από την παρούσα μελέτη για τον κάθε μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Το σύνολο που περικλείεται από τη στικτή γραμμή, αποτελείται από τα ήδη γνωστά γονίδια επιδιόρθωσης, δηλαδή είναι το αντίστοιχο σύνολο με τον όρο «επιδιόρθωση DNA» του Σχήματος 8-3



Σχήμα 8-7: Διάγραμμα Venn με τα γονίδια του *A. thaliana* που αναδείχθηκαν από την παρούσα μελέτη, για τον κάθε μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Το σύνολο που περικλείεται από τη στικτή γραμμή, αποτελείται από τα ήδη γνωστά γονίδια επιδιόρθωσης, δηλαδή είναι το αντίστοιχο σύνολο με τον όρο «επιδιόρθωση DNA» του Σχήματος 8-4.

Πίνακας 8-5: Τα νέα γονίδια για τον άνθρωπο, που προτείνονται στην παρούσα ανάλυση ως γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Για να αποφευχθεί η επανάληψη, τα γονίδια παρουσιάστηκαν σε διάγραμμα Venn, στο Σχήμα 8-6, και ο πίνακας αυτός παρουσιάζει τα γονίδια που περιέχονται στα επιμέρους υποσύνολα.

Σύνολο	#	γονίδια
ΟΑ ∩ επιδιόρθωση DNA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	3	HLTF SMC6 SUMO3
MEB ∩ ΟΑ ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	2	RECQL RECQL5
MEB ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	1	BLM
ΟΑ ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	5	ESCO2 HIST3H2A CHAF1A CHAF1B ASF1A
MEN ∩ επιδιόρθωση DNA	5	NGLY1 CETN1 CREBBP ISY1-RAB43 POLR3B
ΟΑ ∩ επιδιόρθωση DNA	28	HIST1H2AA TTF2 HIST1H2AM HIST1H2AJ HIST1H2AE HIST1H2AD SKIV2L2 ASF1B ANKRD28 ESCO1 ANKRD44 HIST1H2AC SPC25 HIST2H2AA3 ANKRD52 HIST1H2AH CDK5 BOLA3 KAT8 HIST2H2AB HIST1H2AG HIST1H2AI YY2 POLA2 KAT7 HIST2H2AC BOLA2B SPAST
επιδιόρθωση DNA	51	HORMAD2 SMARCD3 DNA repair CSNK1A1L HMGB3 PAPD5 ACTL6B SMARCD1 YEATS4 UBA1 CRY2 RFW2 NOL12 MACROD1 RBM17 SMARCD2 NAE1 SERPINI1 MND1 GPAT4 SERPINB4 UBA6 SERPINB1 ASIC2 SMC1B RRM2 EIF3M SRPRB DUT GNB1L TME189-UBE2V1 CRY1 MPC1 DET1 BOLA2 UBE2D4 ASIC1 CYB5D2 CSNK2A2 CDC20 SERPINB3 EPC1 MCMBP OTUB2 CSNK1A1 SMARCAL1 GPAT3 SMARCA1 UBE2D1 NAP1L1 RNGTT
Καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	492	-δεν παρουσιάζονται

Πίνακας 8-6: Τα νέα γονίδια για το φυτό *A. thaliana* που προτείνονται στην παρούσα ανάλυση ως γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Για να αποφευχθεί η επανάληψη, τα γονίδια παρουσιάστηκαν σε διάγραμμα Venn, στο Σχήμα 8-7, και ο πίνακας αυτός παρουσιάζει τα γονίδια που περιέχονται στα επιμέρους υποσύνολα

Σύνολο	#	γονίδια
MEB ∩ επιδιόρθωση DNA ∩ OA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	1	RECQL4B
MEB ∩ επιδιόρθωση DNA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	1	RPA1E
MEN ∩ επιδιόρθωση DNA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	3	PRP19B ATCSA-1 AT1G49980
OA ∩ επιδιόρθωση DNA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	3	MCM9 RAD51D EXO1
MEB ∩ OA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	1	MED34
MEB∩MOEA∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	1	PARP1
MEB ∩ OA ∩ επιδιόρθωση DNA	2	RECQL1 RECQL3
MEN ∩ OA ∩ επιδιόρθωση DNA	3	SUMO1 SUMO2 SUMO8
MEB ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	17	PCNA2 CHR8 AT1G49250 RPA1D RPA1A RFC1 RPA1C LIG1 RPA2B RPA1B RECQL4A PCNA PARP2 ZDP POLD3 XRCC1 RPA2A
MEN ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	4	PRP19A SNM1 DDB2 CUL4
OA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	15	HAM1 TOP3A DMC1 GEN1 HAM2 AT2G30350 AT4G17760 RAD17 AT5G43530 BOLA2 AT1G18090 RAD51C UBC35 INO80 RAD9
MOEA ∩ καθιερωμένη επιδιόρθωση DNA	1	XRCC4
MEB ∩ επιδιόρθωση DNA	13	RFC2 RFC3 PARG2 POLD2 SRT1 PARG1 STI PRMT6 emb2411 RFC4 RFC5 POLD4 F14L17.24
MEN ∩ επιδιόρθωση DNA	47	HAC5 RBX1A NRPB2 AT2G45700 CSN3 EMB2765 CDKD-1 AT3G02860 RBX1B CYCH1-1 NRPB3 CSN4 CDKD-3 NRPB10 CSN5A NRPB10L AT3G18790 NRPD7 HAC12 AT1G27420/F17L21.21 HAC04 HAC2 UBP13 NRPB12 UBP12 MTPC4 HAC1 AT2G44980 NRPC2 NRPD3B CSN2 NRPB8B CSN6A NRPD2B CSN6B CSN7 NRPB4 AT3G61800 NRPD2 AT5G28740 NRPB7 CDKD-2 NRPB8A CML20 CSN5B CSN8 AT1G19750
EA ∩ επιδιόρθωση DNA	1	EFS
OA ∩ επιδιόρθωση DNA	61	RPN11 ATIM HTA2 AT3G45930 AT4G06634 UBQ8 UBQ14 AT5G05130 UBQ4 UVR8 UBQ10 HIS4 HTA6 PPX2 DSS1(I) AT4G31210 ANK1 LDL3 AT1G48360 UBQ11 PPX1 AT5G42470 HTA10 HTA5 LRS1

		AT5G39770 AT1G07660 HTA3 AT1G07820 HTA12 MRG1 CDKA-1 TEB AT2G45500 MEI1 AT1G20750 UBQ13 AT5G59690 HTA13 AT1G08390 AT5G17070 AT3G07200 AT3G46320 RUB2 AT1G20720 ATM AT5G63690 RAT5 AT1G79950 RPS27AC ISE2 HEN2 AT5G59970 AT3G53730 UBC36 RPS27AB AT1G02670 RPL40B UBQ3 RPS27AA AT3G02820
ΜΟΕΑ η επιδιόρθωση DNA	6	AT4G26630 AT2G32760 AT3G48710 AT5G63550 AT5G55660 AT3G03420
επιδιόρθωση DNA	101	ATEYA UBC30 NPL41 CDC48E ckl5 AT5G25560 HMGB3 AT1G55040 AXL EMB2454 FZR2 AT1G28120 UBA1 AT5G01290 AT3G62970 CHIP AT2G25240 ADK1 AT3G16220 AT1G11800 CDC20-4 AT3G16230 CDC20-2 CHR11 AT5G18650 AT5G28210 FZR3 AT4G36080 AT4G38495 CKL13 AT3G27640 ARP6 AT1G47710 MIA40 AT1G74770 AT5G22920 AT4G24710 CKL2 AT3G45220 ckl10 ckl8 AT1G62170 UBC8 AT2G03270 AT1G27752 BSH AT1G16690 UBA2 AT2G40600 AT2G17930 UBP24 CK1 CKL6 CHR17 AT2G44510 AT1G55460 AT5G52800 UPL4 UBC29 AT2G23070 UBC9 AT5G03450 CDC48D AT5G27570 AT1G18910 AT5G53770 CDC20-1 ckl12 AT5G35970 UBC11 AT1G35530 AT5G60370 AT2G26390 AT3G01890 UEV1D CKA2 CKA1 AT2G47970 AT5G61190 AT1G34770 CDC20.3 PAPP5 UBC37 ckl7 ARP9 AT3G02200 CHR18 FY UBC10 AT2G18770 CKI1 AT1G79020 SYN4 HMGB2 TAF14 CDC48A UPL3 AT1G24290 HMGB1 FZR1 RIN1
καθιερωμένη επιδ. DNA	231	-δεν παρουσιάζονται-

## 9 ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Μέχρις του σημείου αυτού η ανάλυση και η ερμηνεία των βιολογικών φαινομένων που συζητώνται στη διατριβή, λίγο ως πολύ βρισκόταν σε κυτταρικό ή και μοριακό επίπεδο και πάντα αφορούσε τα κύτταρα που τα ίδια είχαν εκτεθεί στην ακτινοβολία. Σε αυτήν την ενότητα γίνεται μία σύντομη αναφορά σε φαινόμενα που παρατηρούνται πιο μακροσκοπικά και αφορούν όχι τα ακτινοβολημένα κύτταρα αφεαυτά, αλλά άλλα κύτταρα γειτονικά ή και εντελώς απομακρυσμένα, τα οποία όπως δείχνουν πολλές μελέτες και αυτά επηρεάζονται από την ακτινοβολήση. Η αναφορά εκτός από κύτταρα περιλαμβάνει και συστημικά φαινόμενα καθώς και σηματοδοτικά μονοπάτια. Τέτοια φαινόμενα συναντώνται υπό το γενικό όρο «Μη στοχευμένη δράση ιοντίζουσας ακτινοβολίας» - 'non targeted effects of ionizing radiation'. Πρόκειται για ενδιαφέροντα και «μυστηριώδη» φαινόμενα, υπό την έννοια ότι κατά καιρούς έχουν προταθεί αντικρουόμενες ερμηνείες και μάλιστα οι ερευνητές δεν συμφωνούν καν στην κατηγοριοποίηση των φαινομένων αυτών. Σχετιζόμενοι λοιπόν όροι που απαντώνται στη βιβλιογραφία είναι «non-targeted effects, bystander effects, abscopal effects, distant effects και systemic effects». Στο παρόν κείμενο θεωρούμε ότι υπό το γενικό όρο «Μη στοχευμένη δράση» βρίσκονται τα α) «φαινόμενο του παρατυχόντος» ως απόδοση του όρου «bystander effect» και β) «συστημικά φαινόμενα».

Στα συστημικά φαινόμενα εντάσσουμε στο παρόν κείμενο τα (i) «απομακρυσμένα φαινόμενα» ως απόδοση του όρου "distant effects", (ii) το «παρεμπίπτον φαινόμενο» ως απόδοση του όρου «abscopal effect» με τη βασική υπόθεση ότι σχετίζονται τόσο με την ανοσολογική αλλά και φλεγμονώδη απόκριση.

### 9.1 Φαινόμενο του παρατυχόντος - bystander effect

Η επικρατούσα άποψη στην Ακτινοβιολογία για πολλά χρόνια ήταν ότι τις βιολογικές συνέπειες της ιοντίζουσας ακτινοβολίας (ΙΑ) τις υφίστανται μόνο εκείνα τα κύτταρα που εκτίθενται άμεσα σε αυτήν και εκείνα που δέχονται επίθεση από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργεί η αλληλεπίδραση της ΙΑ με το νερό που βρίσκεται στους ιστούς. Με τον καιρό όμως άρχισαν να πληθαίνουν οι μαρτυρίες που κατέγραφαν επιδράσεις «μη στοχευμένες» σε κύτταρα τα οποία δεν είχε διαπεράσει η ακτινοβολία, ούτε εν γένει είχαν αλληλεπιδράσει με αυτήν. Τέτοια φαινόμενα ονομάστηκαν 'επαγόμενα από την ακτινοβολία φαινόμενα του παρατυχόντος -radiation-induced bystander effects' (RIBE)

[239-244]. Το φαινόμενο του παρατυχόντος<sup>46</sup>, ή για συντομία το «παρατυχόν φαινόμενο», πρωτοδιατυπώθηκε στην Κοινωνιολογία για να εκφράσει τη συμπεριφορά των ανθρώπων που έτυχε να βρίσκονται στο σημείο όπου συνέβη ένα ακραίο γεγονός. Αν και στην Κοινωνιολογία η διατύπωση του φαινομένου ήταν για να καταδειχθεί η απάθεια των τυχαία παρευρισκομένων, στην Ακτινοβιολογία συμβαίνει το αντίθετο. Σε γειτονικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα όπως: χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, ανταλλαγές γενετικού υλικού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, γονιδιωματική αστάθεια, επαγωγή απόπτωσης, αλλαγές στη μεταγωγή σήματος, προσαρμογή στην ακτινοβολία, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και δημιουργία νεοπλασιών [245-252].

Παρά το μεγάλο πλήθος των δεδομένων που καταγράφουν το φαινόμενο του παρατυχόντος, η πλήρης ερμηνεία του δεν έχει ακόμα διατυπωθεί. Το βέβαιο είναι ότι επιφέρει επιβλαβείς δράσεις και παράπλευρες βλάβες στους υγιείς ιστούς [253], οι οποίες μάλιστα έχουν συνδεθεί και με τη μακροπρόθεσμη επαγωγή καρκίνου [254]. Υπάρχουν βέβαια και μελέτες που αποδίδουν στο φαινόμενο του παρατυχόντος και ευεργετικές συνέπειες [255], όπως την ενίσχυση της ακτινοανθεκτικότητας ή την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [256]. Δεν μπορούμε όμως και να μην αναφερθούμε στις μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι δεν επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός τέτοιου φαινομένου [257-259].

Ψάχνοντας στη βιβλιογραφία για τους υποκείμενους μηχανισμούς του φαινομένου διαπιστώνεται ότι έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο τόσο σε υψηλής LET ακτινοβολίες (σωμάτια -α particles [260-262]) όσο και σε χαμηλής LET ακτινοβολίες (ακτίνες -γ [263, 264]) ακόμα και σε υπερϊώδη ακτινοβολία [265], παραμένει όμως αδιευκρίνιστο εάν είναι το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενέχεται σε όλες αυτές τις περιπτώσεις.

Η δυσκολία στην περιγραφή του φαινομένου και οι πολλές φορές αντιφατικές απόψεις που διατυπώνονται περί αυτού έγκεινται στην ύπαρξη διαφορετικών και πολυεπίπεδων επιμέρους μηχανισμών [266]. Από τις *in vitro* μελέτες διαφαίνονται δύο κύριοι, αλλά όχι αμοιβαία αποκλειόμενοι, μηχανισμοί για τη μετάδοση σήματος από τα ακτινοβολημένα στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα [267]. Ο ένας είναι η διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων, η οποία εξασφαλίζεται από την ικανότητα των χασμοσυνδέσμων να μεταφέρουν σήματα από το ένα κύτταρο στο άλλο [239, 240, 263, 268]. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι διαυλοι επικοινωνίας των κυττάρων, αποτελούνται από δύο εξάδες

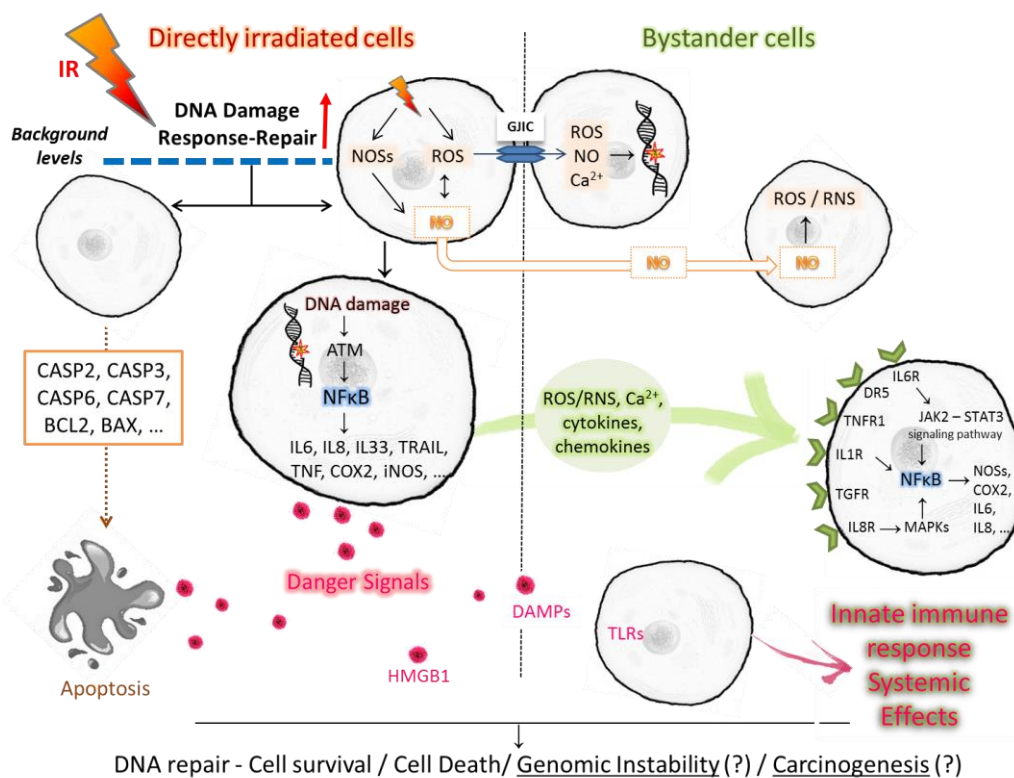
---

<sup>46</sup> **παρατυχών:** ο τυχαία ευρισκόμενος κάπου



πρωτεϊνών, τα κοννεξόνια (connexons), όπου η κάθε πρωτεΐνη λέγεται κοννεξίνη (connexin). Η απόσταση μεταξύ των συνδεδεμένων με χανομοσυνδέσμους κυτταρικών μεμβρανών είναι 2-4 nm, ενώ ο σωληνίσκος που δημιουργείται έχει διάμετρο περίπου 1,5 nm [269]. Ο έτερος προτεινόμενος μηχανισμός σχετίζεται με τα πειράματα *in vitro*, όπου το θρεπτικό μέσο από ακτινοβολημένα κύτταρα μεταφέρεται σε φλάσκα με μη ακτινοβολημένα κύτταρα και ανιχνεύονται οι επιδράσεις. Έτσι το όνομα αυτού του μηχανισμού μπορεί να αποδοθεί στη γλώσσα μας ως 'μεσολαβούμενος από το θρεπτικό μέσο μηχανισμός'. Με το θρεπτικό μέσο μεταφέρονται παράγοντες μικρού μοριακού βάρους που έχουν εκκριθεί από τα ακτινοβολημένα κύτταρα. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι ROS, κυτοκίνες, ιόντα Ασβεστίου, μικρά τμήματα RNA και άλλα. Οι ουσίες αυτές προσλαμβάνονται από τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα ενεργοποιώντας τις αντίστοιχες αντιδράσεις [267, 270-273].

## 9.2 Συστημικά φαινόμενα



Σχήμα 9-1: Αφαιρετικό μοντέλο που περιγράφει τους μεσολαβητές του στρες που ρυθμίζουν τα επαγόμενα από την ακτινοβολία «παρατοχόν φαινόμενα» καθώς και τα «συστημικά φαινόμενα». Damage (or Danger)-associated molecular pattern molecules (DAMPs). Πηγή: Nikitaki et al [274].

Όπως περιγράφεται στο Σχήμα 9-1, η έκθεση κάποιων κυττάρων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία επάγει υψηλά επίπεδα σύνθετων βλαβών DNA, τα οποία ενεργοποιούν τους μηχανισμούς απόκρισης στη βλάβη, αλλά και επιδιόρθωσης του DNA, σε βαθμό που

ξεπερνά την καθιερωμένη απόκριση, εκείνη που επάγεται από το ενδογενές οξειδωτικό στρες. Η ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS), που παράγονται από τα κύτταρα τα οποία αφεαυτά έχουν εκτεθεί στην ακτινοβολία, ενδέχεται να μεταφερθούν σε παρακείμενα (παρατυχόντα) κύτταρα είτε μέσω των χασμοσυνδέσμων της διακυτταρικής επικοινωνίας, είτε απελευθερούμενα στον εξωκυττάριο χώρο από έναν μηχανισμό που μεσολαβείται από το μονοξειδίο του αζώτου (NO).

Επιπλέον, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες<sup>47</sup> που απελευθερώνονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα μπορεί να προσδεθούν σε γειτονικά κύτταρα, στους υποδοχείς που εκείνα διαθέτουν στις μεμβράνες τους. Εκκινούνται τότε ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα JAK2-STAT3, NF-κB ή το MAPK τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν στην έκφραση των κυτοκινών COX2 και NOSs. Εάν κάποια από τα ακτινοβολημένα κύτταρα μπουν σε απόπτωση, λόγω της εκτεταμένης βλάβης στο DNA τους, θα εκριθούν σήματα κινδύνου προς τα γειτονικά κύτταρα. Τα σήματα αυτά ευθύνονται για την εξάπλωση του στρες σε ολόκληρη την έκταση του οργανισμού, προκαλώντας τα συστημικά φαινόμενα. Τα σήματα κινδύνου αναμένεται ότι θα έχουν εκθετική μείωση με το χρόνο σύμφωνα με το βιοφυσικό μοντέλο που περιγράφεται από τους Nikitaki *et al* [274]. Ξεκινά τότε η έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Η πιθανή συνεργηστική δράση άλλων ειδών στρες, πέραν του προκαλούμενου από την ακτινοβολία, όπως λόγω χάρη το στρες της Αντιγραφής ή το στρες που προκαλείται από τα ογκογονίδια [275], ενισχύουν περισσότερο το ενδεχόμενο της γονιδιωματικής αστάθειας και της ανάπτυξης καρκίνου, καθώς ενεργοποιούνται ποικίλοι μοριακοί διακόπτες όπως ο Cdc6 και άλλοι [276].

### 9.3 Παρεμπύπτον φαινόμενο (abscopal effect)

Στη μη στοχευμένη δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας καθώς και στα συστημικά φαινόμενα αυτής εντάσσεται και το ενδιαφέρον φαινόμενο που εδώ το αποδίδουμε στη γλώσσα μας ως “παρεμπύπτον”. Περιγράφει την απρόσμενη και αθέλητη ευνοϊκή για τον οργανισμό συγκυρία όπου ακτινοβολείται κάποιος όγκος σε ένα όργανο και επακολουθεί συρρίκνωση άλλου όγκου που βρίσκεται μακριά, σε άλλο όργανο. Όπως διευκρινίζεται στην εργασία των Siva *et al* [277] με τον ίδιο όρο ογκολόγοι και βιολόγοι αναφέρονται σε διαφορετική έκφραση των συστημικών φαινομένων. Στην παράγραφο αυτή, ακολουθούμε την ερμηνεία των ογκολόγων. (Οι βιολόγοι στον ίδιο όρο αποδίδουν τα

---

<sup>47</sup> **Φλεγμονώδεις κυτοκίνες:** οι κυτοκίνες που ευνοούν τις φλεγμονές.

αρνητικά απομακρυσμένα φαινόμενα.) Με αυτή την έννοια ο όρος «abscopal» πρώτη φορά αποδόθηκε από τον Mole το 1953 στο φαινόμενο όπου ανταποκρίνεται κάποιος όγκος στην ακτινοθεραπεία «ευρισκόμενος σε απόσταση από την ακτινοβολημένη περιοχή, αλλά εντός του ίδιου οργανισμού» [278]. Οι μηχανισμοί που φαίνεται ότι ενέχονται σε αυτό το φαινόμενο είναι η συστηματική έκκριση κυτοκινών, η τοπική φλεγμονή που οδηγεί είτε σε φαινόμενο από απόσταση -distant effect ή σε συστηματική ανοσολογική απόκριση έναντι των καρκινικών αντιγόνων που βρίσκονται στην περιοχή. Σε κάποιες περιπτώσεις χαμηλές δόσεις ακτίνων -Χ, ή -γ, φέρ' ειπείν 0,5 Gy έχει δειχθεί ότι επάγουν αντιφλεγμονώδη δράση η οποία έχει ευεργετικά ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους [279, 280]. Σε αυτήν την περίπτωση τα μακροφάγα των ιστών εκκινούν την απόσβεση της φλεγμονής μέσω της έκκρισης ειδικών αντιφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως την TFG-β.

## 9.4 Βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση των μηχανισμών που συναποτελούν τη μη στοχευμένη δράση ΙΑ

Μέθοδος	Εργαλεία	Αποτέλεσμα
1	Εύρεση γονιδίων για τα bystander και systemic effects	
Βιβλιογραφική αναζήτηση & τυποποιημένη βιβλ/κη αναζήτηση	GLAD4U	Π.9-1
2	Εύρεση κοινών γονιδίων επιδιόρθωσης DNA με τα φαινόμενα bystander /systemic	
α) εύρεση όρων γονιδιακής οντολογίας (ΟΓΟ) σχετιζόμενων με την επιδιόρθωση DNA		
αναζήτηση & επαλήθευση	AmiGO2, QuickGO	Σχ.9-3, Π.9-2
β) εύρεση γονιδίων σχετιζόμενων με την επιδιόρθωση DNA		
Φιλτράρισμα ως προς τους ΟΓΟ	e!Ensembl > Biomart	δεν παρ.
γ) Σύγκριση μεταξύ των λιστών με τα γονίδια DDR/R και bystander ή systemic		
διαγράμματα Venn	BioVenn	Π.9-3
3	Ανεύρεση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων bystander ή systemic που είναι και που δεν είναι γονίδια επιδιόρθωσης DNA	
ανεύρεση αλληλεπιδράσεων	STRING V.10	Σχ.9-4, 9-5
4	Ανεύρεση των επιμέρους μηχανισμών που ενέχονται στα bystander ή τα systemic	
pathway enrichment analysis	David Kegg pathways	Π.9-4,Π.9-5

Σχήμα 9-2: Διάγραμμα ροής της βιοπληροφορικής ανάλυσης για την ανεύρεση μηχανισμών που συναποτελούν τη μη στοχευμένη δράση ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Βασίζομενοι στην απλή ιδέα ότι η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας διαφέρει από το ενδογενές οξειδωτικό στρες κατά κύριο λόγο στην πυκνότητα της εναποτιθέμενης ενέργειας ανά μονάδα όγκου, δηλαδή ο σχηματισμός σύνθετων βλαβών DNA, θέλουμε να εξετάσουμε την υπόθεση ότι αυτό είναι το ειδοποιό χαρακτηριστικό της ΙΑ, μεταξύ των άλλων ειδών στρες για την επαγωγή συστημικών φαινομένων και γενικότερα για τη μη στοχευμένη δράση της ΙΑ.

Με αυτό το σκεπτικό και λόγω του ότι το γενικότερο ενδιαφέρον του εργαστηρίου μας περιστρέφεται γύρω από τις βλάβες DNA επιχειρήσαμε μία βιοπληροφορική ανάλυση τα

αποτελέσματα της οποίας δημοσιεύτηκαν πρόσφατα [274]. Με άξονα αυτή τη δημοσίευση είναι γραμμένη τούτη η παράγραφος.

Στο **Σχήμα 9-2** παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της βιοπληροφορικής ανάλυσης.

#### 9.4.1 Εύρεση γονιδίων για τα φαινόμενα «παταχόν» και «συστημικά»

Η εύρεση των γονιδίων που σχετίζονται είτε με το φαινόμενο του παταχόντος είτε με τα συστημικά φαινόμενα πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, και τα γονίδια αθροιζόμενα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9-1**.

*Πίνακας 9-1: Γονίδια σχετιζόμενα με το φαινόμενο του παταχόντος και γονίδια σχετιζόμενα με τα συστημικά φαινόμενα. Τα γονίδια αυτά προέκυψαν από βιβλιογραφική αναζήτηση [274] καθώς και με τυποποιημένη βιβλιογραφική αναζήτηση μέσω της πλατφόρμας GLAD4U [209].*

Γονίδια που σχετίζονται με το παταχόν φαινόμενο				Γονίδια από το συστημικό φαινόμενο	
AKT1	CXCL8	IL33	P2RX7	AFP	ICAM1
AMBP	CXCR4	IL6	P2RY2	ATM	IL1
ATM	CXCR7	IL8	PRKCE	BCL2	IL1B
ATR	EGR1	JAK2	PRKDC	BRCA1	IL1RN
BAX	FAS	KDM5B	PTGS2	CA12	IL6
BCL2	GJA1	MAPK1	SCO2	CA9	MAPK14
CASP2	GJB1	MAPK8	SLC5A5	CCL20	MAPK8
CASP3	H2AFX	MAPK11	SOD1	CHEK1	MIR100
CASP6	HIF1A	MAPK12	SOD2	CRP	MIR21
CASP7	HMGB1	MAPK13	STAT3	CSF1R	P2RX7
CASP9	HSPA4	MAPK14	TGFB1	CTLA4	TGFB1
CCL2	ICAM1	MIR21	TGFB2	CXCL8	TLR4
CDKN1A	IFI27	MIR663A	TNF	ELK1	TLR7
CLU	IFNA4	MMP1	TNFSF10	FANCD2	TLR9
CXCL10	IFNE	MMP9	TP53	FAS	TNF
CXCL11	IGF1	NFKB1	TP53BP1	FASLG	TP53BP1
CXCL12	IL15	NFKBIA	VCAM1	HMGB1	TP53
CXCL16	IL1A	NOS2		HSPA4	XIAP
CXCL5	IL1B	NQO1			

Αφενός αξιοποιήθηκαν τα γονίδια που εντόπισε στη βιβλιογραφική αναζήτησή της η συνάδελφος Ιφιγένεια Μαυραγάνη και τα ταξινόμησε στους πίνακες Table 1-3 της πρόσφατης κοινής μας δημοσίευσης [274], οι οποίοι δεν παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή καθώς δεν αποτελούν πόνημα της γράφουσας, και αφετέρου με συστηματική αναζήτηση αξιοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής.

Συγκεκριμένα για την ανεύρεση αυτών των γονιδίων έγινε χρήση της πλατφόρμας GLAD4U [209] εισάγοντας τα ακόλουθα λήμματα:

-για το φαινόμενο του παρατυχόντος

«“bystander effects” AND “ionizing radiation”», «“bystander effects” AND “radiation therapy”» και «“bystander effects” AND “radiotherapy”».

-για τα συστημικά φαινόμενα

«“systemic effects” AND “ionizing radiation”», «“non-targeted effects” AND “radiation”», «“systemic effects” AND “radiation therapy”», «“systemic effects” AND “radiotherapy”», «“abscopal effects” AND “ionizing radiation”», «“abscopal effects” AND “radiation therapy”» και «“abscopal effects” AND “radiotherapy”».

#### **9.4.2 Εύρεση κοινών γονιδίων επιδιόρθωσης DNA με τα φαινόμενα bystander /systemic**

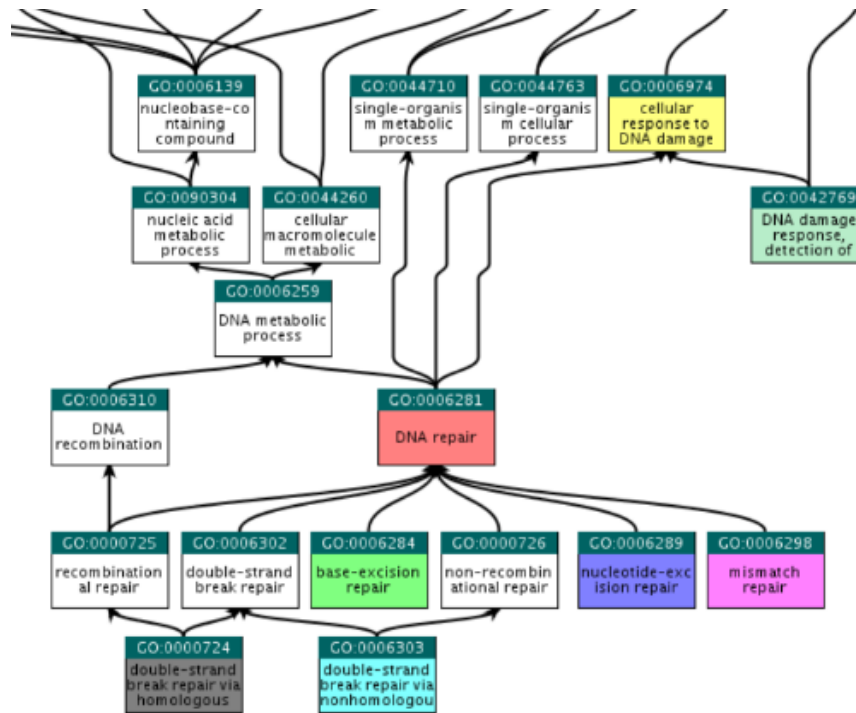
##### **2.α) Εύρεση όρων γονιδιακής οντολογίας σχετιζόμενων με την επιδιόρθωση DNA**

Για να βρούμε τα κοινά γονίδια που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA ανιχνεύονται και στο παρατυχόν φαινόμενο ή στα συστημικά, πρέπει πρώτα να εντοπίσουμε τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.

Αν και στην παρούσα διατριβή έχουμε αναφερθεί ξανά στην εύρεση αυτών των γονιδίων, παρουσιάζεται εδώ ξανά η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την ανάλυση και για το λόγο ότι εκτός από τους επιμέρους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA συμπεριελήφθησαν και γενικότεροι όροι που αφορούν την απόκριση στη βλάβη DNA και παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 9-2**.

Με αμφίδρομη αναζήτηση στο AmiGO2 [205] και στο QuickGO [206], εντοπίστηκαν οι όροι γονιδιακής οντολογίας (gene ontology terms-GO terms) ενδιαφέροντος. Για να γίνει επιβεβαίωση ότι δεν παρελήφθη κάποιος όρος δημιουργήθηκε το «δέντρο των προγόνων» για τους όρους γονιδιακής οντολογίας (ancestor tree of GO terms). Το δέντρο παρουσιάζεται στο **Σχήμα 9-3** και οι όροι που επελέχθησαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9-2**.

Παρόλο που από το δέντρο φαίνεται ότι κάθε άλλος όρος του **Πίνακα 9-2** είναι τέκνο του γενικού όρου «cellular response to DNA damage stimulus» και άρα τα γονίδια των τέκνων περιλαμβάνονται στα γονίδια του πατρικού όρου, επιλέξαμε να προχωρήσουμε με όλους τους όρους, ώστε αργότερα να παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα συσχετιζόμενα με τους ειδικότερους όρους, όπου αυτό ήταν δυνατό.



Σχήμα 9-3: Δέντρο των προγόνων για τους όρους γονιδιακής οντολογίας που μας ενδιαφέρουν.

Πίνακας 9-2: Οι όροι γονιδιακής οντολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των κοινών γονιδίων επιδιόρθωσης DNA και του παρατυχόντος φαινομένου ή των συστημικών φαινομένων.

GO term	Annotation	Abbreviation
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	DD response
GO:0006281	DNA repair	DNA repair
GO:0042769	DNA damage response, detection of DNA damage	DD response
GO:0006284	base excision repair	BER
GO:0006289	nucleotide-excision repair	NER
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination	HR
GO:0006303	double-strand break repair via nonhomologous end joining	NHEJ
GO:0006298	mismatch repair	MMR

## 2.β) Προσδιορισμός των γονιδίων επιδιόρθωσης DNA

Η εξαγωγή των γονιδίων έγινε από τη βάση δεδομένων Ensembl > Biomart [232, 235] χρησιμοποιώντας τον κάθε όρο ως φίλτρο, δημιουργώντας ισάριθμες με τους ΟΓΟ λίστες γονιδίων, οι οποίες δεν παρουσιάζονται.

## 2.γ) Σύγκριση μεταξύ των λιστών με τα γονίδια DDR/R και bystander ή systemic

Τα γονίδια του Πίνακα 9-1 συγκρίθηκαν με τις λίστες που δημιουργήθηκαν στο προηγούμενο βήμα ώστε να χωριστούν τα γονίδια που σχετίζονται με τη μη στοχευμένη δράση ΙΑ

- σε αυτά που είναι επιπλέον αναγνωρισμένα και ως γονίδια επιδιόρθωσης και
- σε αυτά που δεν είναι γονίδια επιδιόρθωσης.

Όσα ανευρέθησαν να έχουν και τις δύο ιδιότητες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 9-3). Η σύγκριση για λόγους συντομίας έγινε μέσω του εργαλείου BioVenn [211], το οποίο δημιουργεί διαγράμματα Venn.

*Πίνακας 9-3: αριστερά) γονίδια που συμμετέχουν στο φαινόμενο του παρατυχόντος και είναι ταυτοχρόνως και γονίδια επιδιόρθωσης DNA. δεξιά) γονίδια που συμμετέχουν στα συστημικά φαινόμενα της ΙΑ και είναι ταυτοχρόνως και γονίδια επιδιόρθωσης DNA. Κάθε γονίδιο συνοδεύεται και με τον πιο εξειδικευμένο ΟΓΟ στον οποίο συμμετέχει.*

Γονίδια Bystander-DDR/R (17 από τα 74)		Γονίδια Systemic-DDR/R (11 από τα 36)	
BER και NER και HR	TP53	BER και NER και HR	TP53
	HR ATM		HR ATM
	HR ATR		HR BRCA1
	HR H2AFX		HR TP53BP1
	HR TP53BP1	DNA repair	CHEK1
HR and NHEJ	PRKDC	DNA repair	FANCD2
DNA repair	HMGB1	DNA repair	HMGB1
DD response	BAX	DD response	BCL2
DD response	BCL2	DD response	CTLA4
DD response	CASP2	DD response	MAPK14
DD response	CASP3	DD response	TNF
DD response	CASP9	DD response	XIAP
DD response	CDKN1A		
DD response	MAPK12		
DD response	MAPK14		
DD response	SOD2		
DD response	TNF		



#### 9.4.3 *Ανεύρεση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων bystander ή systemic που είναι και που δεν είναι γονίδια επιδιόρθωσης DNA*

Στην παράγραφο αυτή για λόγους συντομίας, με τον όρο «γονίδια επιδιόρθωσης» εννοούμε τα γονίδια που περιέχονται σε όλους τους ΟΓΟ του **Πίνακα 9-2**. Δηλαδή εκτός από τα γονίδια τα οποία περιλαμβάνονται στους πέντε κύριους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, στην ανάλυση αυτή συμπεριλαμβάνονται και γονίδια που ανήκουν στην απόκριση στις βλάβες DNA (DNA damage response) καθώς και στην ανίχνευση των βλαβών DNA. Όλοι αυτοί οι όροι για συντομία θα αναφέρονται ως DDR/R (DNA damage repair/response). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων που υπάγονται στα DDR/R και εκείνων που δεν υπάγονται, τόσο για το φαινόμενο του παρατυχόντος όσο και για τα συστημικά φαινόμενα μελετήθηκαν με τη χρήση του εργαλείου STRING v.10 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [229]. Και φυσικά όταν λέμε «αλληλεπιδράσεις γονιδίων» εννοούμε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια. Αναζητήσαμε αλληλεπιδράσεις που αφορούν γονίδια του ανθρώπου, οι οποίες να έχουν προκύψει αποκλειστικά από πειραματικά δεδομένα. Θεωρήσαμε ένα μέσο επίπεδο εμπιστοσύνης. Οι παράμετροι για να προκύψουν αυτά ήταν οι ακόλουθες:

-Organism: homo sapiens

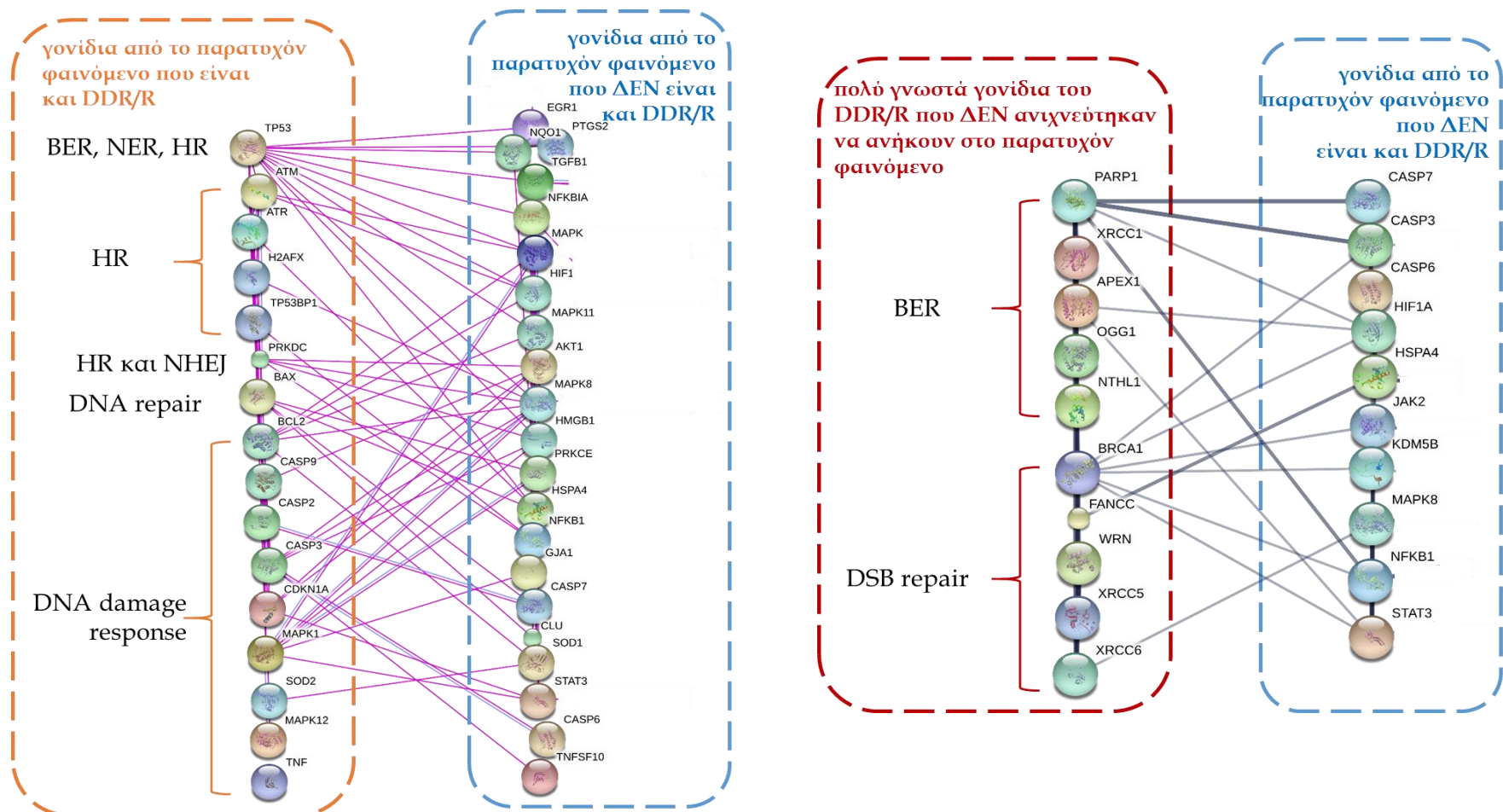
-Active prediction methods: only experiments (μεταξύ των διαθέσιμων επιλογών που είναι: neighborhood, gene fusion, co-occurrence, experiments, databases, text mining)

-Level of confidence: 0.4

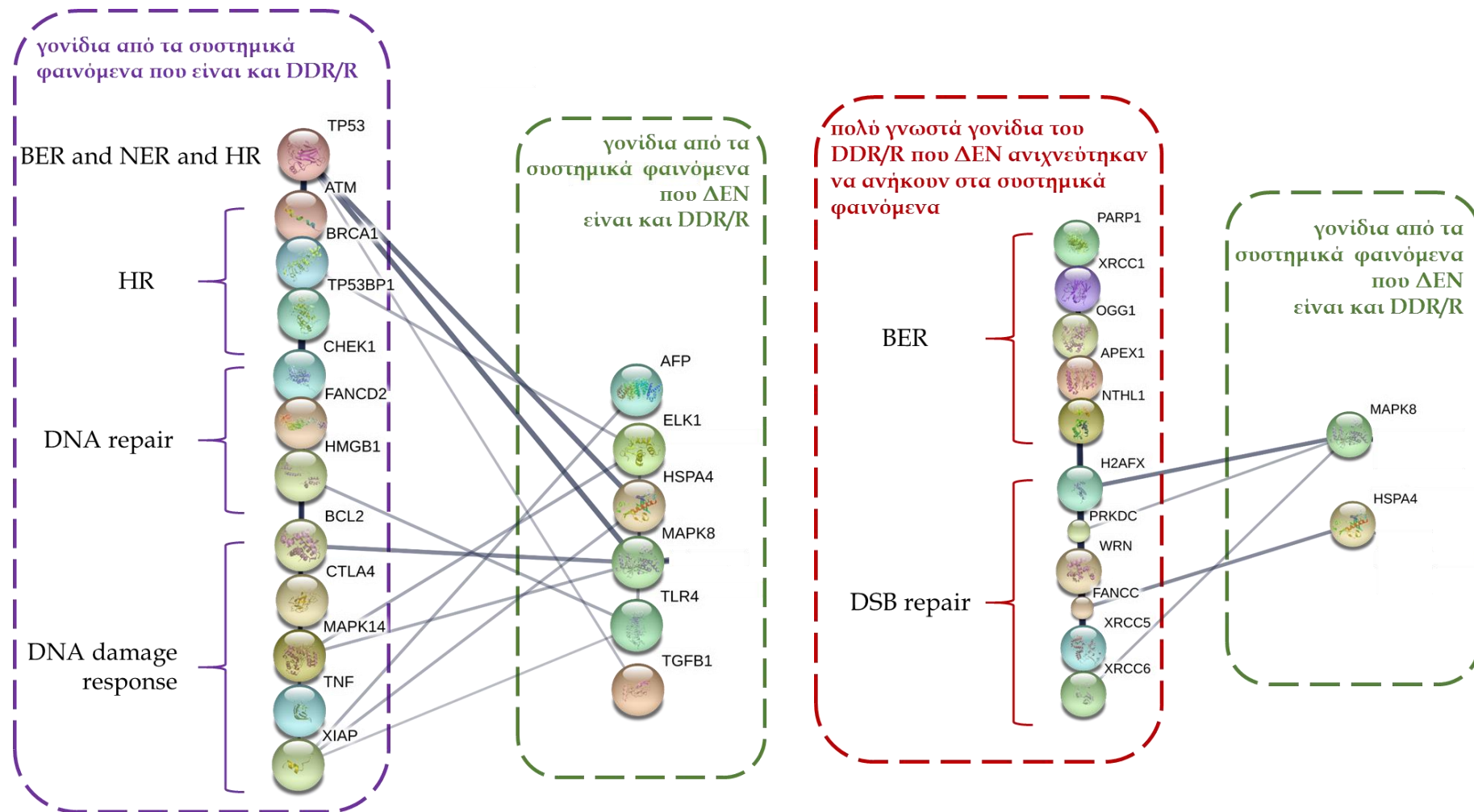
Για το παρατυχόν φαινόμενο, το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 9-4<sup>A</sup>**. Επιπλέον για το παρατυχόν φαινόμενο εξετάστηκαν, άλλα γονίδια που δεν περιέχονται σε αυτό και είναι πολύ σημαντικά γονίδια για την επιδιόρθωση του DNA. Τα γονίδια αυτά για το μηχανισμό εκτομής βάσης (MEK/BER) είναι: *PARP1*, *XRCC1*, *APE1*, *OGG* και *NTH1* και για την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων: *BRCA1*, *H2AFX*, *53BP1*, *FANCC*, *WRN*, *PRKDC*, *XRCC5/Ku80* και *XRCC6/Ku70*. Η σύγκριση αυτών των σημαντικών γονιδίων του DDR/R έγινε με όσα γονίδια από το παρατυχόν φαινόμενο δεν είναι και γονίδια επιδιόρθωσης DNA. Αυτή η εξαίρεση έγινε ώστε το αποτέλεσμα που θα παραχθεί να περιέχει όσο το δυνατό νέα πληροφορία. (Δημιουργήθηκε και το αντίστοιχο διάγραμμα περιλαμβάνοντας όλα τα γονίδια του παρατυχόντος φαινομένου, και παρουσιάζει πολλές περισσότερες αλληλεπιδράσεις. Το διάγραμμα αυτό δεν το εμφανίζουμε στο παρόν κείμενο.) Οι επιπλέον αλληλεπιδράσεις προέρχονται ακριβώς από το λόγο ότι και τα μεν και τα δε είναι γονίδια επιδιόρθωσης και άρα αλληλεπιδρούν, δε δίδουν κάποια

πληροφορία για τη συμμετοχή του DDR/R στο παρατυχόν φαινόμενο. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται στο **Σχήμα 9-4<sup>B</sup>**.

Ακριβώς οι ίδιες διαδικασίες ακολουθήθηκαν για τα γονίδια που βρέθηκαν από την ανάλυσή μας να συμμετέχουν στα συστημικά φαινόμενα της ΙΑ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 9-5<sup>A, B</sup>**.



Σχήμα 9-4: Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης για την ανίχνευση της συμμετοχής των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στο παρατοχόν φαινόμενο. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών δημιουργήθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων STRING v.10. Αριστερά: Αλληλεπιδράσεις γονιδίων που ανήκουν στο παρατοχόν φαινόμενο και επιπλέον ανήκουν και σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA (Πίνακας 9-3) με τα υπόλοιπα γονίδια που ανήκουν στο παρατοχόν φαινόμενο αλλά δεν ανήκουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Δεξιά αλληλεπιδράσεις βασικών γονιδίων επιδιόρθωσης DNA (που δεν ανιχνεύτηκαν να ανήκουν στο παρατοχόν φαινόμενο) με τα γονίδια που ανήκουν στο παρατοχόν φαινόμενο, αλλά δεν είναι ταυτόχρονα και γονίδια επιδιόρθωσης. Αυτή η τελευταία εξαίρεση έγινε για να αυξηθεί η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων, καθώς εάν εξετάζαμε όλα τα γονίδια που ανήκουν στο παρατοχόν φαινόμενο, οι εμφανιζόμενες αλληλεπιδράσεις θα ήταν πολύ περισσότερες, αλλά η αιτιολογία τους θα ήταν ότι πρόκειται ούτως ή άλλως για γονίδια επιδιόρθωσης και γι' αυτό και αλληλεπιδρούν.



Σχήμα 9-5: Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης για την ανίχνευση της συμμετοχής των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στα συστημικά φαινόμενα ΙΑ. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών δημιουργήθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων STRING v.10. Αριστερά: Αλληλεπιδράσεις γονιδίων που ανήκουν στα συστημικά φαινόμενα και επιπλέον ανήκουν και σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA (Πίνακας 9-3) με τα υπόλοιπα γονίδια που ανήκουν στα συστημικά φαινόμενα αλλά δεν ανήκουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Δεξιά αλληλεπιδράσεις βασικών γονιδίων επιδιόρθωσης DNA (που δεν ανιχνεύτηκαν να ανήκουν στα συστημικά φαινόμενα) με τα γονίδια που ανήκουν στα συστημικά φαινόμενα, αλλά δεν είναι ταυτόχρονα και γονίδια επιδιόρθωσης.

#### 9.4.4 *Ανεύρεση των επιμέρους μηχανισμών που ενέχονται στα bystander ή τα systemic*

Η KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) είναι μία βάση δεδομένων για την κατανόηση λειτουργιών υψηλού επιπέδου αλληλεπιδράσεων που αφορούν κάποιο βιολογικό σύστημα (κύτταρο, οργανισμό ή ακόμα και οικοσύστημα)[281]. Από την πλατφόρμα DAVID 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/>) [282, 283], έγινε Ανάλυση Εμπλουτισμού μονοπατιών KEGG ώστε να ανευρεθούν οι επιμέρους μηχανισμοί που ενέχονται στο παρατυχόν φαινόμενο καθώς και στα συστημικά φαινόμενα. Τα επλεγμένα ως σημαντικότερα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζονται στους **Πίνακες 9-4** και **9-5**. Παρατηρούμε ότι οι δύο κύριοι μηχανισμοί που σχετίζονται με το παρατυχόν φαινόμενο αλλά και με τα συστημικά φαινόμενα είναι η απόπτωση και ο Toll-like receptor (TLR) signalling pathway, υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητα αυτών των μηχανισμών στη μεταγωγή του σήματος στα γειτονικά (παρατυχόντα) ή στα απομακρυσμένα (συστημικά) κύτταρα και τους ιστούς.

Πίνακας 9-4: Επιλεγμένα μονοπάτια που συμμετέχουν στο παρατυχόν φαινόμενο, όπως προέκυψαν από την KEGG pathway enrichment analysis, με χρήση της βάσης δεδομένων DAVID 6.7. Παρουσιάζονται μόνο όσα έχουν τιμή  $p < 10^{-3}$ .

Term	Toll-like receptor signaling pathway	Apoptosis	NOD-like receptor signaling pathway	Cytokine-cytokine receptor interaction	MAPK signaling pathway	Natural killer cell mediated cytotoxicity	p53 signaling pathway	T cell receptor signaling pathway
PValue	<u>3,55E-07</u>	<u>2,88E-06</u>	<u>1,01E-05</u>	<u>1,92E-04</u>	2,16E-04	2,64E-02	4,34E-02	9,78E-02
	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>
	IL6	TNF	IL6	IL6	TNF	ICAM1	CHEK1	TNF
	TNF	XIAP	TNF	TNF	MAPK14	TNF	FAS	MAPK14
	MAPK14	BCL2	XIAP	CCL20	IL1B	FASLG	ATM	CTLA4
	IL1B	IL1B	MAPK14	IL1B	ELK1	FAS		
	MAPK8	FASLG	IL1B	FASLG	FASLG			
	TLR4	FAS	MAPK8	FAS	MAPK8			
	TLR7	ATM		TGFB1	FAS			
	TLR9			CSF1R	TGFB1			

Πίνακας 9-5: Επιλεγμένα μονοπάτια που συμμετέχουν στα συστημικά φαινόμενα, όπως προέκυψαν από την KEGG pathway enrichment analysis, με χρήση της βάσης δεδομένων DAVID 6.7. Παρουσιάζονται μόνο όσα έχουν τιμή  $p < 10^{-3}$ .

Term	Apoptosis	Toll-like receptor *	Cytokine-cytokine receptor int/ction	NOD-like receptor *	Chemokine *	p53*	MAPK *	VEGF *	JAK-STAT *
<b>PValue</b>	<u>2,04E-13</u>	<u>3,19E-11</u>	<u>1,34E-10</u>	<u>7,88E-10</u>	5,82E-07	7,71E-06	2,41E-05	1,52E-04	1,41E-03
	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>γονίδια</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>	<b>Genes</b>
	TNF	IL6	IL6	IL6	AKT1	CDKN1A	AKT1	AKT1	AKT1
	TP53	TNF	TNF	TNF	CCL2	CASP3	CASP3	PTGS2	IL6
	NFKBIA	IL8	CCL2	CCL2	IL8	CASP9	TNF	CASP9	IFNE
	NFKB1	NFKBIA	CXCL5	MAPK12	CXCL5	BAX	MAPK12	MAPK12	IFNA4
	ATM	NFKB1	IL8	IL8	CXCR4	TP53	MAPK13	MAPK13	JAK2
	AKT1	MAPK11	IL24	MAPK13	CXCL16	IGF1	MAPK14	MAPK14	IL15
	CASP6	CXCL11	IL15	MAPK14	NFKBIA	ATR	TP53	MAPK11	IL24
	TNFSF10	CXCL10	CXCL11	NFKBIA	NFKB1	ATM	IL1B		STAT3
	CASP3	AKT1	CXCL12	IL1B	JAK2		NFKB1		
	CASP9	MAPK12	TGFB1	NFKB1	CXCL11		MAPK11		
	BAX	MAPK13	CXCL10	MAPK11	CXCL12		TGFB1		
	CASP7	MAPK14	TGFB2		STAT3		IL1A		
	BCL2	IFNA4	TNFSF10		CXCL10		TGFB2		
	IL1B	IL1B	CXCR4						
	IL1A		IFNE						
			CXCL16						
			IFNA4						

Ο αστερίσκος \* δηλώνει ότι το αναφερόμενο μονοπάτι έχει επιπλέον τη φράση «receptor interaction».





# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## Συμπεράσματα σχετικά με τη βελτιστοποίηση της τεχνικής

Η οπτικοποίηση των σύνθετων βλαβών DNA με *in situ* ανοσοφθορισμό είναι μια τεχνικά δύσκολη και επίπονη υπόθεση. Έγινε όμως εφικτή με διαδοχική προτυποποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου και κυρίως με την προσθήκη του σταδίου εξαγωγής πρωτεϊνών πριν τη μονιμοποίηση. Η ανάλυση των εικόνων φθορισμού για τη μελέτη των σύνθετων βλαβών DNA έγινε εφικτή μέσω της νέας παραμέτρου, που εισήχθη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, για το συνεντοπισμό  $P_{clc}$ .

Η παράμετρος  $P_{clc}$  που εισήχθη είναι σε θέση να ανιχνεύει πολύ μικρές διαφορές μεταξύ της περιοχής των εστιών των δίκλωνων θραύσεων DNA (ΔΚΘ) και του υπόλοιπου πυρήνα του κύτταρου. Ανταποκρίνεται πολύ καλά σε εικόνες με πολύ σήμα υποβάθρου. Είναι ικανή να παράγει συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των πειραμάτων καθώς κανονικοποιεί τις φωτεινότητες για κάθε κύτταρο.

Αποτελεί έκφραση για ένα κύτταρο και όχι για ολόκληρη την εικόνα, που κάνουν άλλες καθιερωμένες πρακτικές εκτίμησης συνεντοπισμού. Επίσης διατηρεί την τοπολογία των εστιών φθορισμού έτσι η εξαγόμενη πληροφορία αφορά τις ΔΚΘ και τις ιδιότητές τους.

Εκτός από τις σύνθετες βλάβες DNA, η παράμετρος  $P_{clc}$  μπορεί να εκφράσει και άλλες ιδιότητες, όπως τον εντοπισμό των ΔΚΘ σε σχέση με την ευχρωματίνη/ετεροχρωματίνη. Ήδη νεότερα μέλη της ομάδας μας αναλύουν περαιτέρω τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από τούτη τη διατριβή με αυτόν τον προσανατολισμό. Ο συνεργάτης μας Pavel Lobashevsky αναπτύσσει περαιτέρω τα λογισμικά του ώστε να τη συμπεριλάβει σε μια νεότερη έκδοση του λογισμικού JCount, καθώς αναγνωρίζει ότι πρόκειται για πολύ χρήσιμο εργαλείο. Όσο αυξάνεται η LET της ακτινοβολίας, ή όσο πιο συγκεντρωμένη είναι η δέσμη, τόσο ευκολότερη γίνεται η ανίχνευση συνεντοπισμού μεταξύ των δίκλωνων θραύσεων DNA και των βλαβών βάσεων.

Συγκρίνοντας τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης των ΔΚΘ που χρησιμοποιήσαμε,  $\gamma$ -H2AX και 53BP1 ως προς την ικανότητά τους να απεικονίζουν τις ΔΚΘ θεωρούμε ότι και οι δύο είναι πολύ αξιόπιστες, όμως η  $\gamma$ -H2AX ανταποκρίνεται καλύτερα στις μεγάλες δόσεις. Το γεγονός ότι δεν έχει ενδογενή συγκέντρωση την κάνει καλύτερη και στις μικρές δόσεις, γιατί δεν εμφανίζει σήμα υποβάθρου.

### **Συμπεράσματα Βιοφυσικής Σημασίας**

Η αύξηση της πολυπλοκότητας της βλάβης αυξανόμενης της LET είναι η ουσιαστικότερη παρατήρηση που προέκυψε από την ανάλυση των πειραμάτων. Η αύξηση της LET διαπιστώθηκε ότι προκαλεί αύξηση του μεγέθους των εστιών φθορισμού για τις δίκλωνες θραύσεις με ταυτόχρονη ελάττωση των πληθυσμών τους ανά κύτταρο, χωρίς το γινόμενο αυτό να είναι σταθερό για την ίδια δόση, επομένως για τις ΔΚΘ, διαπιστώθηκε ότι επισυμβαίνουν πυκνότερες, όταν αυξάνει η LET και επιπλέον χάνεται η σχέση αντιστοιχίας '1:1' που συνδέει τις εστίες φθορισμού με τις δίκλωνες θραύσεις, όταν πρόκειται για ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Εξερευνώντας την παρεμπόδιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης ΔΚΘ, είτε με χημικό τρόπο (προσθήκη αναστολέων επιδιόρθωσης NU7026, NU7441) είτε λόγω γενετικής τροποποίησης (MO59K σε σύγκριση με τα MO59J), συνάγεται ότι και οι τρεις συνθήκες, όπως είναι αναμενόμενο, επιφέρουν καθυστέρηση στην επιδιόρθωση. Επιπλέον παρατηρήθηκε μετατόπιση του χρονικού σημείου που εμφανίζεται ο μέγιστος αριθμός εστιών αργότερα στο χρόνο εστιών. Συγκρίνοντας μεταξύ τους τις τρεις συνθήκες παρεμπόδισης της επιδιόρθωσης φαίνεται πως η μεγαλύτερη παρεμπόδιση συμβαίνει με τη χρήση του αναστολέα NU7441, επόμενη είναι η περίπτωση των κυττάρων MO59J και τρίτη η χρήση του αναστολέα NU7026. Η διαφορετική συμπεριφορά μεταξύ των αναστολέων της DNA-PK ερμηνεύεται με τη διαπίστωση ότι ο NU7026 είναι περισσότερο επιλεκτικός από τον NU7441. Ο NU7441 ενδεχομένως να αναστέλλει τη λειτουργία και άλλων πρωτεϊνών.

Η ανίχνευση των σύνθετων βλαβών DNA που περιλαμβάνουν ΔΚΘ και βλάβες βάσεων έγινε εφικτή μέσω της βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου και της εισαγωγής της παραμέτρου για την εκτίμηση του συνεντοπισμού  $P_{dc}$ . Συγκεκριμένα, για τις ακτίνες -Χ εντοπίστηκε αύξηση της παραμέτρου σε σχέση με το μη ακτινοβολημένο στο 120 %, στην περίπτωση της παρεμβολής κατευθυντήρα δέσμης για τις ακτίνες -Χ βρέθηκε να αυξάνει την τιμή της στο 200%, ενώ για τα σωματίδια -α η παράμετρος  $P_{dc}$  παρουσίασε αύξηση της τάξης του 360%.

### **Επιτεύγματα βιοπληροφορικής ανάλυσης**

Από τη βιοπληροφορική ανάλυση προέκυψαν ενδιαφέροντα ευρήματα, όπως η ανάδειξη δεκάδων νέων γονιδίων που προτείνουμε ως πολύ πιθανά να συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA στον άνθρωπο και κυρίως το μεγάλο πλήθος των γονιδίων που προτείνουμε αναφέρεται στα φυτά.

Προσδιορίστηκαν γονίδια τα προϊόντα των οποίων προτείνονται ως βιοδείκτες για την ανίχνευση του στρες που μπορεί να έχει υποστεί ένας οργανισμός (έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, οξειδωτικό στρες ή στρες αντιγραφής). Επίσης προσδιορίστηκαν τα γονίδια που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα βιολογικό δοσίμετρο, για την έκθεση στις διάφορες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, από τα γονίδια των φυτών.

Μελετήθηκαν συγκριτικά ως προς τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA οι οργανισμοί *H. sapiens* και το φυτό *A. Thaliana*, από όπου προέκυψαν σημαντικά ευρήματα ως προς την ομοιότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

Αναζητήσαμε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA για πιθανούς στόχους αναστολέων (επιδιόρθωσης) με εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου, στα πλαίσια της Συνδυαστικής Φονικότητας και προτείναμε την Πολλαπλή Φονικότητα, εξελίσσοντας περαιτέρω την ιδέα.

Μελετήσαμε συστηματικά τη λεγόμενη Μη στοχευμένη Δράση Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας και ειδικότερα ως προς τη συμμετοχή των γονιδίων επιδιόρθωσης DNA, όπου διαπιστώθηκε ότι έχουν κυρίαρχο λόγο, μαζί με την ανοσολογική απόκριση και κάποια σηματοδοτικά μονοπάτια.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι η τεχνική που αναπτύξαμε είναι πολύ δυναμική καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε επίπεδο κυττάρου και είναι ικανή να διακρίνει τις διαφορές στα επίπεδα συνεντοπισμού που προκαλούνται από τα διάφορα είδη ακτινοβολίας.



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Schipler, A. and G. Iliakis, *DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(16): p. 7589-605.
2. Nikitaki, Z., *Μελέτη για τη μεθοδολογία εκτίμησης απορροφούμενης δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας και διερεύνηση διαφοροποίησης στην G2 Χρωμοσωμική ακτινοεναίσθησία ατόμων του γενικού πληθυσμού*, in *Τομέας Φυσικής* 2009, Ε.Μ.Π.: Αθήνα.
3. Aziz, K., S. Nowsheen, G. Pantelias, G. Iliakis, V.G. Gorgoulis, and A.G. Georgakilas, *Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(3): p. 334-50.
4. Nikitaki, Z., C. Hellweg, A.G. Georgakilas, and J.L. Ravanat, *Stress-induced DNA Damage biomarkers: Applications and limitations* *Front. Chem.*, 2015. **3**: p. 35-50.
5. Milanowska, K., J. Krwawicz, G. Papaj, J. Kosinski, K. Poleszak, J. Lesiak, E. Osinska, K. Rother, and J.M. Bujnicki, *REPAIRtoire--a database of DNA repair pathways*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D788-92.
6. Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, *BER in Homo sapiens*, in *REPAIRtoire*.
7. Nikitaki, Z., I. Michalopoulos, and A.G. Georgakilas, *Molecular inhibitors of DNA repair: searching for the ultimate tumor killing weapon*. *Future Med Chem*, 2015. **7**(12): p. 1-16.
8. Whitmore, S.E., C.S. Potten, C.A. Chadwich, P.T. Strickland, and W.L. Morison, *Effect of photoreactivating light on UV radiation-induced alterations in human skin*. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 2001. **17**: p. 213-217.
9. Ward, J.F., *Biochemistry of DNA lesions*. *Radiat Res Suppl*, 1985. **8**: p. S103-11.
10. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. *J Radiat Res*, 2008. **49**(3): p. 203-10.
11. Georgakilas, A.G., *Processing of DNA damage clusters in human cells: Current status of knowledge*. *Mol. Biosyst.*, 2008. **4**: p. 30-35.
12. Ward, J.F., *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*, 1988. **35**: p. 95-125.
13. Roots, R. and S. Okada, *Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray induced strand breaks of killing of mammalian cells*. *Radiat. Res.*, 1975. **64**: p. 306-320.
14. Mandelkern, M., J.G. Elias, D. Eden, and D.M. Crothers, *The dimensions of DNA in solution*. *J Mol Biol*, 1981. **152**(1): p. 153-61.
15. Brenner, D.J. and J.F. Ward, *Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks*. *Int J Radiat Biol*, 1992. **61**(6): p. 737-48.
16. Semenenko, V.A. and R.D. Stewart, *Fast Monte Carlo simulation of DNA damage formed by electrons and light ions*. *Phys. Med. Biol.*, 2006. **51**: p. 1693-1706.
17. deLara, C.M., T.J. Jenner, K.M. Stewart Townsend, S.J. Marsden, and P. O'Neill, *The effect of dimethyl sulfoxide on the induction of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells by alpha particles*. *Radiation Research*, 1995. **144**: p. 43-49.

18. Houghton Mifflin Company, *scavenger* (n.d.), in *The American Heritage® Medical Dictionary* 2007.
19. The McGraw-Hill Companies, Inc, *Free Radical Scavenger*, in *McGraw-Hill Concise Dictionary of Modern Medicine* 2002.
20. Stewart, R.D., V.K. Yu, A.G. Georgakilas, C. Koumenis, J.H. Park, and D.J. Carlson, *Effects of radiation quality and oxygen on clustered DNA lesions and cell death*. *Radiat. Res.*, 2011. **175**: p. 587–602.
21. Sage, E. and L. Harrison, *Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell survival*. *Mutat. Res.*, 2011. **711**(1-2): p. 123-133.
22. Eccles, L.J., P. O'Neill, and M.E. Lomax, *Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe?* *Mutat. Res.*, 2011. **711**(1-2): p. 134-141.
23. Georgakilas, A.G., P. O'Neill, and R.D. Stewart, *Induction and repair of clustered DNA Lesions: What do we know so far?* *Radiat. Res.*, 2013. **180**: p. 100–109.
24. Pateras, I.S., S. Havaki, X. Nikitopoulou, K. Vougas, P.A. Townsend, M.I. Panayiotidis, A.G. Georgakilas, and V.G. Gorgoulis, *The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where*. *Pharmacol Ther*, 2015. **154**: p. 36-56.
25. Gulston, M., J. Fulford, T. Jenner, C. de Lara, and P. O'Neill, *Clustered DNA damage induced by  $\gamma$  radiation in human fibroblasts (HF 19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA is revealed as Fpg and Nth sensitive sites*. *Nucleic Acids Res.*, 2002. **30**: p. 3464-3472.
26. Gulston, M., C. de Lara, T. Jenner, E. Davis, and P. O'Neill, *Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation*. *Nucleic Acids Res.*, 2004. **32**: p. 1602-1609.
27. Tsao, D., P. Kalogerinis, I. Tabrizi, M. Dingfelder, R.D. Stewart, and A.G. Georgakilas, *Induction and processing of clustered DNA lesions in human monocytes exposed to low doses of HZE  $^{56}\text{Fe}$  particles*. *Radiat. Res.*, 2007. **168**: p. 87-97.
28. Cunniffe, S., P. O'Neill, M.M. Greenberg, and M.E. Lomax, *Reduced repair capacity of a DNA clustered damage site comprised of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 2-deoxyribonolactone results in an increased mutagenic potential of these lesions*. *Mutat Res*, 2014. **762**: p. 32-9.
29. Yang, N., M.A. Chaudhry, and S.S. Wallace, *Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells*. *DNA Repair*, 2006. **5**: p. 43-51.
30. Mladenov, E. and G. Iliakis, *Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways*. *Mutat. Res.*, 2011. **711**(1-2): p. 61-72.
31. Hair, J.M., G.I. Terzoudi, V.I. Hatzi, K.A. Lehockey, D. Srivastava, W. Wang, G.E. Pantelias, and A.G. Georgakilas, *BRCA1 role in the mitigation of radiotoxicity and chromosomal instability through repair of clustered DNA lesions*. *Chem. Biol. Interact.*, 2010. **188** p. 350-358.
32. Mladenov, E., S. Magin, A. Soni, and G. Iliakis, *DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation*. *Semin Cancer Biol*, 2016. **37-38**: p. 51-64.

33. Ballarini, F., S. Altieri, S. Bortolussi, M. Carante, E. Giroletti, and N. Protti, *The BIANCA model/code of radiation-induced cell death: application to human cells exposed to different radiation types*. *Radiat Environ Biophys*, 2014. **53**(3): p. 525-33.
34. Held, K.D., H. Kawamura, T. Kaminuma, A.E. Paz, Y. Yoshida, Q. Liu, H. Willers, and A. Takahashi, *Effects of Charged Particles on Human Tumor Cells*. *Front Oncol*, 2016. **6**: p. 23.
35. Rahmanian, S., R. Taleei, and H. Nikjoo, *Radiation induced base excision repair (BER): A mechanistic mathematical approach*. *DNA Repair*, 2014. **22**(0): p. 89-103.
36. Taleei, R., P.M. Girard, and H. Nikjoo, *DSB repair model for mammalian cells in early S and G1 phases of the cell cycle: application to damage induced by ionizing radiation of different quality*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015. **779**: p. 5-14.
37. McNaught, A.D. and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology: heterocyclic compounds*. 1997, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
38. Weinfeld, M., R.S. Mani, I. Abdou, R.D. Aceytuno, and J.N. Glover, *Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(5): p. 262-71.
39. Singh, S.K., W. Wu, W. Wu, M. Wang, and G. Iliakis, *Extensive Repair of DNA Double-Strand Breaks in Cells Deficient in the DNA-PK-Dependent Pathway of NHEJ after Exclusion of Heat-Labile Sites*. *Radiat. Res.*, 2009. **172**(2): p. 152-164.
40. Singh, S.K., M. Wang, C. Staudt, and G. Iliakis, *Post-irradiation chemical processing of DNA damage generates double-strand breaks in cells already engaged in repair*. *Nucleic Acids Res.*, 2011. **39**(19): p. 8416-8429.
41. Singh, S.K., A. Bencsik-Theilen, E. Mladenov, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, and G. Iliakis, *Reduced contribution of thermally labile sugar lesions to DNA double strand break formation after exposure to heavy ions*. *Radiat Oncol*, 2013. **8**: p. 77.
42. Stephens, P.J., C.D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G.R. Bignell, L.J. Mudie, E.D. Pleasance, K.W. Lau, D. Beare, L.A. Stebbings, S. McLaren, M.L. Lin, D.J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A.P. Butler, J.W. Teague, M.A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N.P. Carter, L.A. Morsberger, C. Iacobuzio-Donahue, G.A. Follows, A.R. Green, A.M. Flanagan, M.R. Stratton, P.A. Futreal, and P.J. Campbell, *Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development*. *Cell*, 2011. **144**(1): p. 27-40.
43. Forment, J.V., A. Kaidi, and S.P. Jackson, *Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering*. *Nat. Rev. Cancer*, 2012. **12**(10): p. 663-670.
44. Kloosterman, Wigard P., M. Tavakoli-Yaraki, Markus J. van Roosmalen, E. van Binsbergen, I. Renkens, K. Duran, L. Ballarati, S. Vergult, D. Giardino, K. Hansson, Claudia A.L. Ruivenkamp, M. Jager, A. van Haeringen, Elly F. Ippel, T. Haaf, E. Passarge, R. Hochstenbach, B. Menten, L. Larizza, V. Guryev, M. Poot, and E. Cuppen, *Constitutional Chromothripsis Rearrangements Involve Clustered Double-Stranded DNA Breaks and Nonhomologous Repair Mechanisms*. *Cell Reports*, 2012. **1**(6): p. 648-655.
45. Molenaar, J.J., J. Koster, D.A. Zwiijnenburg, P. van Sluis, L.J. Valentijn, I. van der Ploeg, M. Hamdi, J. van Nes, B.A. Westerman, J. van Arkel, M.E. Ebus, F. Haneveld, A. Lakeman, L. Schild, P. Molenaar, P. Stroeken, M.M. van Noesel, I. Ora, E.E. Santo, H.N. Caron, E.M. Westerhout, and R. Versteeg, *Sequencing of*

- neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes.* Nature, 2012. **483**(7391): p. 589-93.
46. Costes, S.V., A. Ponomarev, J.L. Chen, D. Nguyen, F.A. Cucinotta, and M.H. Barcellos-Hoff, *Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains.* PLoS Comput. Biol., 2007. **3**(8): p. e155.
  47. Asaithamby, A. and D.J. Chen, *Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation.* Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 87-99.
  48. Desai, N., E. Davis, P. O'Neill, M. Durante, F.A. Cucinotta, and H. Wu, *Immunofluorescence detection of clustered gamma-H2AX foci induced by HZE-particle radiation.* Radiat. Res., 2005. **164**: p. 518-522.
  49. Durante, M. and F.A. Cucinotta, *Heavy ion carcinogenesis and human space exploration.* Nat. Rev. Cancer, 2008. **8**(6): p. 465-472.
  50. Liu, Y., R. Prasad, W.A. Beard, P.S. Kedar, E.W. Hou, D.D. Shock, and S.H. Wilson, *Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta.* J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13532-41.
  51. Chaudhuri, J. and F.W. Alt, *Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 541-52.
  52. Robertson, A.B., A. Klungland, T. Rognes, and I. Leiros, *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.
  53. Crown Human Genome Center, *MBD4*, in *GeneCards1997*, Weizmann Institute of Science in Israel.
  54. Stelzer, G., N. Rosen, I. Plaschkes, S. Zimmerman, M. Twik, S. Fishilevich, T.I. Stein, R. Nudel, I. Lieder, Y. Mazor, S. Kaplan, D. Dahary, D. Warshawsky, Y. Guan-Golan, A. Kohn, N. Rappaport, M. Safran, and D. Lancet, *The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses.* Curr Protoc Bioinformatics, 2016. **54**: p. 1 30 1-1 30 33.
  55. Crown Human Genome Center, *TDG*, in *GeneCards1997*, Weizmann Institute of Science in Israel.
  56. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleotide excision repair*, in *KEGG PATHWAY Database*, Kanehisa Laboratories.
  57. NIH US National Library of MEDICINE, *Health Conditions, trichothiodystrophy*, in *Genetics Home Reference2017*.
  58. Lehmann, A.R., *DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy.* Biochimie, 2003. **85**(11): p. 1101-11.
  59. Petrusheva, I.O., A.N. Evdokimov, and O.I. Lavrik, *Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair.* Acta Naturae, 2014. **6**(1): p. 23-34.
  60. Li, J., A. Bhat, and W. Xiao, *Regulation of nucleotide excision repair through ubiquitination.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(12): p. 919-29.
  61. Sung, P., V. Bailly, C. Weber, L.H. Thompson, L. Prakash, and S. Prakash, *Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase.* Nature, 1993. **365**(6449): p. 852-5.
  62. Barakat, K. and J. Tuszynski, *Nucleotide Excision Repair Inhibitors: Still a Long Way to Go*, in *New Research Directions in DNA Repair*, P.C. Chen, Editor. 2013, InTech.



63. Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, *unwound DNA with XPB, XPD and RNAP [TCR] in REPAIRtoire.*
64. Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, *MMR in Homo sapiens, in REPAIRtoire.*
65. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Mismatch repair - Reference pathway, in KEGG PATHWAY Database, Kanehisa Laboratories.*
66. Wang, H., Y. Yang, M.J. Schofield, C. Du, Y. Fridman, S.D. Lee, E.D. Larson, J.T. Drummond, E. Alani, P. Hsieh, and D.A. Erie, *DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 14822-7.
67. Zou, Y., Y. Liu, X. Wu, and S.M. Shell, *Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses.* J Cell Physiol, 2006. **208**(2): p. 267-73.
68. Kim, H.S., R. Hromas, and S.-H. Lee, *Emerging Features of DNA Double-Strand Break Repair in Humans.* New Research Directions in DNA Repair. 2013.
69. Wang, H., Z. Shao, L.Z. Shi, P.Y.-H. Hwang, L.N. Truong, M.W. Berns, D.J. Chen, and X. Wu, *CtIP Protein Dimerization Is Critical for Its Recruitment to Chromosomal DNA Double-stranded Breaks.* The Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(25): p. 21471-21480.
70. Carreira, A., J. Hilario, I. Amitani, R.J. Baskin, M.K.K. Shivji, A.R. Venkitaraman, and S. C.Kowalczykowski, *The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA Binding Selectivity of RAD51.* Cell, 2009. **136**(6): p. 1032-1043.
71. Li, X., X.-P. Zhang, J.A. Solinger, K. Kiiianitsa, X. Yu, E.H. Egelman, and W.-D. Heyer, *Rad51 and Rad54 ATPase activities are both required to modulate Rad51-dsDNA filament dynamics.* Nucleic Acids Research, 2007. **35**(12): p. 4124-4140.
72. Wikipedia contributors, *Heteroduplex* 2016, Wikipedia, The Free Encyclopedia. p. Heteroduplex
73. Wikipedia contributors, *Gene conversion*, 2016, Wikipedia, The Free Encyclopedia.
74. The Editors of Encyclopædia Britannica, *Holliday junction*, in *Encyclopædia Britannica* 2013.
75. Thompson, L.H., *Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography.* Mutat Res, 2012. **751**(2): p. 158-246.
76. Li, X. and W.-D. Heyer, *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance.* Cell Res, 2008. **18**(1): p. 99-113.
77. DiBiase, S.J., Z.C. Zeng, R. Chen, T. Hyslop, W.J. Curran, Jr., and G. Iliakis, *DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus.* Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1245-53.
78. Wang, H., Z.C. Zeng, T.A. Bui, E. Sonoda, M. Takata, S. Takeda, and G. Iliakis, *Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group.* Oncogene, 2001. **20**(18): p. 2212-24.
79. Wang, H., Z.C. Zeng, A.R. Perrault, X. Cheng, W. Qin, and G. Iliakis, *Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(8): p. 1653-60.

80. Cadet, J., J.-L. Ravanat, M. TavernaPorro, H. Menoni, and D. Angelov, *Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions*. *Cancer Lett.*, 2012. **327**(1): p. 5-15.
81. Floyd, R.A., C.A. Lewis, and P.K. Wong, *High-pressure liquid chromatography--electrochemical detection of oxygen free radicals*. *Methods Enzymol*, 1984. **105**: p. 231-7.
82. Dizdaroglu, M., *The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links*. *J Chromatogr*, 1984. **295**(1): p. 103-21.
83. Halliwell, B. and M. Dizdaroglu, *The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques*. *Free Radic Res Commun*, 1992. **16**(2): p. 75-87.
84. Collins, A., J. Cadet, B. Epe, and C. Gedik, *Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(9): p. 1833-6.
85. Pouget, J.-P., J.-L. Ravanat, T. Douki, M.-J. Richard, and J. Cadet, *Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of gamma-radiation: comparison between the HPLC-EC and comet assays*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1999. **75**: p. 51-58.
86. Pouget, J.P., S. Frelon, J.L. Ravanat, I. Testard, F. Odin, and J. Cadet, *Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles*. *Radiat. Res.*, 2002. **157**: p. 589-595.
87. Madugundu, G.S., J. Cadet, and J.R. Wagner, *Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(11): p. 7450-60.
88. Regulus, P., B. Duroux, P.A. Bayle, A. Favier, J. Cadet, and J.L. Ravanat, *Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. **104**(35): p. 14032-7.
89. Perdiz, D., P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, and E. Sage, *Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(35): p. 26732-42.
90. Sinha, R.P. and D.P. Hader, *UV-induced DNA damage and repair: a review*. *Photochem Photobiol Sci*, 2002. **1**(4): p. 225-36.
91. Breton, J., F. Sichel, F. Bianchini, and V. Prevost, *Measurement of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine by a Commercially Available ELISA Test: Comparison with HPLC/Electrochemical Detection in Calf Thymus DNA and Determination in Human Serum*. *Analytical Letters*, 2003. **36**(1): p. 123-134.
92. Koch, C.J. and A.R. Giandomenico, *The alkaline elution technique for measuring DNA single strand breaks: increased reliability and sensitivity*. *Anal Biochem*, 1994. **220**(1): p. 58-65.
93. Milner, A.E., A.T. Vaughan, and I.P. Clark, *Measurement of DNA damage in mammalian cells using flow cytometry*. *Radiat Res*, 1987. **110**(1): p. 108-17.
94. Peng, T., H.M. Shen, Z.M. Liu, L.N. Yan, M.H. Peng, L.Q. Li, R.X. Liang, Z.L. Wei, B. Halliwell, and C.N. Ong, *Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes and its association with expression and polymorphisms of hOGG1: a study of adolescents in a high risk region for hepatocellular carcinoma in China*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(10): p. 2186-93.

95. Chan, L.Y., S. Kosuri, and D. Endy, *Refactoring bacteriophage T7*. Molecular Systems Biology, 2005. **1**: p. 2005.0018-2005.0018.
96. Wikipedia contributors, *Lambda phage*, 2016, Wikipedia, The Free Encyclopedia.
97. Sutherland, B.M., P.V. Bennett, O. Sidorkina, and J. Laval, *Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 103-8.
98. Sutherland, B.M., P.V. Bennett, A.G. Georgakilas, and J.C. Sutherland, *Evaluation of number average length analysis in quantifying double strand breaks in genomic DNAs*. Biochemistry, 2003. **42**: p. 3375-3384.
99. Sutherland, B.M., P.V. Bennett, J.C. Sutherland, and J. Laval, *Clustered DNA damages induced by X-rays in human cells*. Radiat. Res., 2002. **157**: p. 611-616.
100. Georgakilas, A.G., S.M. Holt, J.M. Hair, and C.W. Loftin, *Measurement of oxidatively-induced clustered DNA lesions using a novel adaptation of single cell gel electrophoresis (Comet Assay)*. Curr. Protoc. Cell Biol., 2010. **47** p. 6.11.1-6.11.17.
101. Oestreicher, U., D. Samaga, E. Ainsbury, A.C. Antunes, A. Baeyens, L. Barrios, C. Beinke, P. Beukes, W.F. Blakely, A. Cucu, A. De Amicis, J. Depuydt, S. De Sanctis, M. Di Giorgio, K. Dobos, I. Dominguez, P.N. Duy, M.E. Espinoza, F.N. Flegal, M. Figel, O. Garcia, O. Monteiro Gil, E. Gregoire, C. Guerrero-Carbajal, I. Guclu, V. Hadjidekova, P. Hande, U. Kulka, J. Lemon, C. Lindholm, F. Lista, K. Lumniczky, W. Martinez-Lopez, N. Maznyk, R. Meschini, R. M'Kacher, A. Montoro, J. Moquet, M. Moreno, M. Noditi, J. Pajic, A. Radl, M. Ricoul, H. Romm, L. Roy, L. Sabatier, N. Sebastia, J. Slabbert, S. Sommer, M. Stuck Oliveira, U. Subramanian, Y. Suto, T. Que, A. Testa, G. Terzoudi, A. Vral, R. Wilkins, L. Yanti, D. Zafiroopoulos, and A. Wojcik, *RENEB intercomparisons applying the conventional Dicentric Chromosome Assay (DCA)*. Int J Radiat Biol, 2017. **93**(1): p. 20-29.
102. Karachristou, I., M. Karakosta, A. Pantelias, V. Hatzi, G. Pantelias, A. Thanassoulas, P. Karaiskos, P. Dimitriou, and G.I. Terzoudi, *Biodosimetry for High-Dose Exposures Based on Dicentric Analysis in Lymphocytes Released from the G2-Block by Caffeine*. Radiat Prot Dosimetry, 2016. **172**(1-3): p. 230-237.
103. Terzoudi, G.I., G. Pantelias, F. Darroudi, K. Barszczewska, I. Buraczewska, J. Depuydt, D. Georgieva, V. Hadjidekova, V.I. Hatzi, I. Karachristou, M. Karakosta, R. Meschini, R. M'Kacher, A. Montoro, F. Palitti, A. Pantelias, G. Pepe, M. Ricoul, L. Sabatier, N. Sebastia, S. Sommer, A. Vral, D. Zafiroopoulos, and A. Wojcik, *Dose assessment intercomparisons within the RENEB network using G0-lymphocyte prematurely condensed chromosomes (PCC assay)*. Int J Radiat Biol, 2017. **93**(1): p. 48-57.
104. International Atomic Energy Agency, *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. Vol. EPR-Biodosimetry. 2011.
105. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1084-104.
106. Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner, *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 5858-5868.
107. Bin, P. and Y. Zheng, *[Association between gamma-H2AX and DNA double-strand breaks]*. Wei Sheng Yan Jiu, 2007. **36**(4): p. 520-2.

108. Crowe, S.L., S. Tsukerman, K. Gale, T.J. Jorgensen, and A.D. Kondratyev, *Phosphorylation of histone H2A.X as an early marker of neuronal endangerment following seizures in the adult rat brain*. J Neurosci, 2011. **31**(21): p. 7648-56.
109. Ding, D., Y. Zhang, J. Wang, X. Wang, D. Fan, L. He, X. Zhang, Y. Gao, Q. Li, and H. Chen,  *$\gamma$ -H2AX/53BP1/pKAP-1 foci and their linear tracks induced by in vitro exposure to radon and its progeny in human peripheral blood lymphocytes*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 38295.
110. Moroni, M., D. Maeda, M.H. Whitnall, W.M. Bonner, and C.E. Redon, *Evaluation of the Gamma-H2AX Assay for Radiation Biodosimetry in a Swine Model*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(7): p. 14119-14135.
111. Moquet, J., S. Barnard, and K. Rothkamm, *Gamma-H2AX biodosimetry for use in large scale radiation incidents: comparison of a rapid '96 well lyselx' protocol with a routine method*. PeerJ, 2014. **2**: p. e282.
112. Bonner, W.M., C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, O.A. Sedelnikova, S. Solier, and Y. Pommier,  *$\gamma$ H2AX and cancer*. Nature reviews. Cancer, 2008. **8**(12): p. 957-967.
113. Fernandez-Capetillo, O., S.K. Mahadevaiah, A. Celeste, P.J. Romanienko, R.D. Camerini-Otero, W.M. Bonner, K. Manova, P. Burgoyne, and A. Nussenzweig, *H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis*. Dev Cell, 2003. **4**(4): p. 497-508.
114. Marti, T.M., E. Hefner, L. Feeney, V. Natale, and J.E. Cleaver, *H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 9891-6.
115. Solier, S., O. Sordet, K.W. Kohn, and Y. Pommier, *Death receptor-induced activation of the Chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathways*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(1): p. 68-82.
116. Kinner, A., W. Wu, C. Staudt, and G. Iliakis,  *$\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(17): p. 5678-5694.
117. W. G. Hale, V.A.S., J. P. Margham, *isogenic*, in *Collins Dictionary of Biology*2005.
118. Houghton Mifflin Company, *frameshift mutation*, in *The American Heritage® Medical Dictionary*2007.
119. Adler, J., S.N. Pagakis, and I. Parmryd, *Replicate-based noise corrected correlation for accurate measurements of colocalization*. J Microsc, 2008. **230**(Pt 1): p. 121-33.
120. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2011. **300**(4): p. C723-C742.
121. Costes, S.V., D. Daelemans, E.H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett, *Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells*. Biophys J, 2004. **86**(6): p. 3993-4003.
122. Bocker, W. and G. Iliakis, *Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells*. Radiat Res, 2006. **165**(1): p. 113-24.
123. Ivashkevich, A.N., O.A. Martin, A.J. Smith, C.E. Redon, W.M. Bonner, R.F. Martin, and P.N. Lobachevsky, *gammaH2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 49-60.

124. Martin, O.A., A. Ivashkevich, S. Choo, L. Woodbine, P.A. Jeggo, R.F. Martin, and P. Lobachevsky, *Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity*. DNA Repair (Amst), 2013. **12**(10): p. 844-55.
125. Nikitaki, Z., V. Nikolov, I.V. Mavragani, I. Plante, D. Emfietzoglou, G. Iliakis, and A.G. Georgakilas, *Non-DSB clustered DNA lesions. Does theory colocalize with the experiment?* Radiation Physics and Chemistry, 2016. **128**: p. 26-35.
126. Nikitaki, Z., V. Nikolov, I.V. Mavragani, E. Mladenov, A. Mangelis, D.A. Laskaratou, G.I. Fragkoulis, C.E. Hellweg, O.A. Martin, D. Emfietzoglou, V.I. Hatzi, G.I. Terzoudi, G. Iliakis, and A.G. Georgakilas, *Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET)*. Free Radical Research, 2016: p. 1-45.
127. Cucinotta, F.A., J.M. Pluth, J.A. Anderson, J.V. Harper, and P. O'Neill, *Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end joining*. Radiat Res, 2008. **169**(2): p. 214-22.
128. Taleei, R. and H. Nikjoo, *Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle*. Mutat Res, 2013. **756**(1-2): p. 206-12.
129. Mariotti, L.G., G. Pirovano, K.I. Savage, M. Ghita, A. Ottolenghi, K.M. Prise, and G. Schettino, *Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79541.
130. Dolman, M.E.M., I. van der Ploeg, J. Koster, L.T. Bate-Eya, R. Versteeg, H.N. Caron, and J.J. Molenaar, *DNA-Dependent Protein Kinase As Molecular Target for Radiosensitization of Neuroblastoma Cells*. PLOS ONE, 2016. **10**(12): p. e0145744.
131. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τομέας Φυσικής, *Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσικής*. 1999: Συμμετρία.
132. Asaithamby, A., B. Hu, and D.J. Chen, *Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011. **108**: p. 8293-8298.
133. Newlands, E.S., M.F.G. Stevens, S.R. Wedge, R.T. Wheelhouse, and C. Brock, *Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials*. Cancer Treat Rev, 1997. **23**(1): p. 35-61.
134. Colvin, O.M., *An overview of cyclophosphamide development and clinical applications*. Curr Pharm Des, 1999. **5**(8): p. 555-560.
135. Deeks, E.D., *Olaparib: first global approval*. Drugs, 2015. **75**(2): p. 231-40.
136. Patel, A.G., S. De Lorenzo, K.S. Flatten, G.G. Poirier, and S.H. Kaufmann, *Failure of Iniparib to Inhibit Poly(ADP-ribose) Polymerase in Vitro*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(6): p. 1655-1662.
137. Reed, A.M., M.L. Fishel, and M.R. Kelley, *Small-molecule inhibitors of proteins involved in base excision repair potentiate the anti-tumorigenic effect of existing chemotherapeutics and irradiation*. Future Oncol, 2009. **5**(5): p. 713-26.
138. Barret, J.M., M. Cadou, and B.T. Hill, *Inhibition of nucleotide excision repair and sensitisation of cells to DNA cross-linking anticancer drugs by F 11782, a novel fluorinated epipodophylloid*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(2): p. 251-8.
139. Jiang, H. and L.Y. Yang, *Cell cycle checkpoint abrogator UCN-01 inhibits DNA repair: association with attenuation of the interaction of XPA and ERCC1 nucleotide excision repair proteins*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4529-34.

140. Aune, G.J., T. Furuta, and Y. Pommier, *Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action*. *Anticancer Drugs*, 2002. **13**(6): p. 545-55.
141. Helleday, T., *Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(6): p. 955-60.
142. Deakynne, J.S., F. Huang, J. Negri, N. Tolliday, S. Cocklin, and A.V. Mazin, *Analysis of the activities of RAD54, a SWI2/SNF2 protein, using a specific small-molecule inhibitor*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(44): p. 31567-80.
143. Aziz, K., S. Nowsheen, and A.G. Georgakilas, *Nanotechnology in cancer therapy: targeting the inhibition of key DNA repair pathways*. *Curr Mol Med*, 2010. **10**(7): p. 626-39.
144. Chernikova, S.B., J.C. Game, and J.M. Brown, *Inhibiting homologous recombination for cancer therapy*. *Cancer Biol Ther*, 2012. **13**(2): p. 61-8.
145. Peddi, P., C.W. Loftin, J.S. Dickey, J.M. Hair, K.J. Burns, K. Aziz, D.C. Francisco, M.I. Panayiotidis, O.A. Sedelnikova, W.M. Bonner, T.A. Winters, and A.G. Georgakilas, *DNA-PKcs deficiency leads to persistence of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor cells*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(10): p. 1435-43.
146. Srivastava, M., M. Nambiar, S. Sharma, Subhas S. Karki, G. Goldsmith, M. Hegde, S. Kumar, M. Pandey, Ram K. Singh, P. Ray, R. Natarajan, M. Kelkar, A. De, B. Choudhary, and Sathees C. Raghavan, *An Inhibitor of Nonhomologous End-Joining Abrogates Double-Strand Break Repair and Impedes Cancer Progression*. *Cell*, 2012. **151**(7): p. 1474-1487.
147. Reinhardt, H.C., H. Jiang, M.T. Hemann, and M.B. Yaffe, *Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(19): p. 3112-9.
148. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. *Mol Oncol*, 2011. **5**(4): p. 387-93.
149. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Αντιμεταβολίτες*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
150. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Γεμισιταβίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
151. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Φλονταραμπίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
152. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Φθοριουρακίλη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
153. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Κυταραβίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
154. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Καπεσιταβίνη*  
Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
155. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Αζακιτιδίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
156. Kantarjian, H.M., S. O'Brien, J. Cortes, F.J. Giles, S. Faderl, J.P. Issa, G. Garcia-Manero, M.B. Rios, J. Shan, M. Andreeff, M. Keating, and M. Talpaz, *Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia*. *Cancer*, 2003. **98**(3): p. 522-8.
157. Kantarjian, H., J.P. Issa, C.S. Rosenfeld, J.M. Bennett, M. Albitar, J. DiPersio, V. Klimek, J. Slack, C. de Castro, F. Ravandi, R. Helmer, 3rd, L. Shen, S.D. Nimer, R.

- Leavitt, A. Raza, and H. Saba, *Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study*. *Cancer*, 2006. **106**(8): p. 1794-803.
158. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Κλοφαραβίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
  159. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Πεντοστατίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
  160. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Νελαραβίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
  161. Steven Isakoff, M., PhD *ABT-888 and Temozolomide for Metastatic Breast Cancer and BRCA1/2 Breast Cancer*, in *NCT01009788*, Dana-Farber Cancer Institute, Beth Israel Deaconess Medical Center, and Abbott, Editors. November 2009.
  162. Abbott, *A Phase I Study of ABT-888 in Combination With Temozolomide in Cancer Patients*, in *NCT00526617* August 2007.
  163. National Cancer Institute, *ABT-888 With Cyclophosphamide in Refractory BRCA-Positive Ovarian, Primary Peritoneal or Ovarian High-Grade Serous Carcinoma, Fallopian Tube Cancer, Triple-Negative Breast Cancer, and Low-Grade Non-Hodgkins Lymphoma*, in *NCT01306032* January 2011.
  164. National Cancer Institute, *888 Plus Metronomic Cyclophosphamide to Treat Cancer*, in *NCT01445522* December 2008.
  165. National Cancer Institute, *Safety Study of ABT-888 Plus Topotecan Hydrochloride to Treat Patients With Solid Tumors and Lymphomas*, in *NCT00553189* August 2007.
  166. Cedars-Sinai Medical Center, *A Phase I Study of Veliparib (ABT-888) in Combination With Gemcitabine and Intensity Modulated Radiation Therapy in Patients With Locally Advanced, Unresectable Pancreatic Cancer (VelGemRad)*, in *NCT01908478*, AbbVie, Editor July 2013.
  167. AbbVie (prior sponsor, Abbott), , *A Clinical Study Conducted in Multiple Centers Evaluating Escalating Doses of Veliparib in Combination With Capecitabine and Radiation in Patients With Locally Advanced Rectal Cancer*, in *NCT01589419* June 2012.
  168. AbbVie, *A Study Evaluating Safety and Efficacy of the Addition of ABT-888 Plus Carboplatin Versus the Addition of Carboplatin to Standard Chemotherapy Versus Standard Chemotherapy in Subjects With Early Stage Triple Negative Breast Cancer*, in *NCT02032277*, United States Oncology, et al., Editors. April 2014.
  169. Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, *Trial of ICM With or Without AZD2281 (Olaparib) in Patients With Advanced Pancreatic Cancer*, in *NCT01296763*, National Cancer Institute, Editor January 2011.
  170. AstraZeneca, *Olaparib Treatment in BRCA Mutated Ovarian Cancer Patients After Complete or Partial Response to Platinum Chemotherapy*, in *NCT01874353*, European Network of Gynecological Oncology Trial Groups (ENGOT) and Myriad Genetics - BRAC Analysis test for FDA Premarket Approval (PMA), Editors. September 2013.
  171. Lisette Nixon, *Parp Inhibitor in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (PIN)*, in *NCT01788332*, AstraZeneca, Editor January 2014.
  172. AstraZeneca, *Olaparib as Adjuvant Treatment in Patients With Germline BRCA Mutated High Risk HER2 Negative Primary Breast Cancer (OlympiA)*, in *NCT02032823*, Breast International Group, et al., Editors. April 2014.

173. Cancer Research UK, *Olaparib and Temozolomide in Treating Patients With Relapsed Glioblastoma*, in NCT01390571 July 2011.
174. Sanofi, *A Phase 2 Trial of Standard Chemotherapy, With or Without BSI-201, in Patients With Triple Negative Metastatic Breast Cancer*, in NCT00540358, BiPar Sciences, Editor October 2007.
175. Sanofi, *Study of the Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitor BSI-201 in Patients With Newly Diagnosed Malignant Glioma*, in NCT00687765 July 2008.
176. Sanofi, *SAR240550 in Combination With Gemcitabine/Cisplatin in Non-small Cell Lung Cancer*, in NCT01086254 May 2010.
177. Sanofi, *A Phase 3, Multi-Center Study of Gemcitabine/Carboplatin, With or Without BSI-201, in Patients With ER-, PR-, and Her2-Negative Metastatic Breast Cancer*, in NCT00938652 July 2009.
178. Sanofi, *Trial of Gemcitabine/Carboplatin With or Without Iniparib (SAR240550) (a PARP1 Inhibitor) in Subjects With Previously Untreated Stage IV Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) (ECLIPSE)*, in NCT01082549 March 2010.
179. Cancer Research UK (Centre for Drug Development), *A trial of a PARP inhibitor called AG014699 and temozolomide for advanced cancer*, in CRUKD/03/042, Pfizer, Editor 22/05/2003.
180. Clovis Oncology, Inc., *A Study of Rucaparib as Switch Maintenance Following Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Platinum-Sensitive, High-Grade Serous or Endometrioid Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal or Fallopian Tube Cancer (ARIEL3)*, in NCT01968213 January 2014.
181. Bedikian, A.Y., N.E. Papadopoulos, K.B. Kim, W.J. Hwu, J. Homsy, M.R. Glass, S. Cain, P. Rudewicz, L. Vernillet, and P. Hwu, *A phase IB trial of intravenous INO-1001 plus oral temozolomide in subjects with unresectable stage-III or IV melanoma*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(7): p. 756-63.
182. BioMarin Pharmaceutical *Study of BMN 673, a PARP Inhibitor, in Patients With Advanced or Recurrent Solid Tumors*, in NCT01286987 December 2010.
183. National Cancer Institute (NCI), *Pilot Trial of BMN 673, an Oral PARP Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors and Deleterious BRCA Mutations*, in NCT01989546 November 2013.
184. BioMarin Pharmaceutical, *A Study Evaluating Talazoparib (BMN 673), a PARP Inhibitor, in Advanced and/or Metastatic Breast Cancer Patients With BRCA Mutation (EMBRACA Study)*, in NCT01945775 October 2013.
185. University of Alabama at Birmingham, *Evaluation of Lucanthone to Whole Brain Radiation Therapy in Patients With Brain Metastases From Non-Small Cell Lung Cancer*, in NCT02014545, Spectrum Pharmaceuticals, Inc, Editor November 2013.
186. Case Comprehensive Cancer Center, *Methoxyamine and Temozolomide in Treating Patients With Advanced Solid Tumors*, in NCT00892385, National Cancer Institute (NCI), Editor August 2007.
187. Tracoon Pharmaceuticals, Inc, *Study of TRC102 in Combination With Pemetrexed in Cancer Patients*, in NCT00692159 June 2008.
188. National Cancer Institute (NCI), *TRC102 and Temozolomide for Relapsed Solid Tumors and Lymphomas*, in NCT01851369 April 2013.



189. Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C., *An Efficacy and Safety Study for Yondelis (Trabectedin) in Patients With Advanced Relapsed Ovarian Cancer*, in NCT00113607, PharmaMar, Editor April 2005.
190. Janssen Research & Development, LLC *A Study Comparing the Combination of Trabectedin (YONDELIS) and DOXIL/CAELYX With DOXIL/CAELYX for the Treatment of Advanced-Relapsed Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer*, in NCT01846611, PharmaMar, Editor October 2013.
191. Xian-Janssen Pharmaceutical, Ltd. , *A Study of Trabectedin (YONDELIS) in Patients With Locally Advanced or Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma*, in NCT01692678 August 2012.
192. Goupillon, C., *From basic research to therapeutic applications: Dbait molecules discovered to boost radiotherapy in clinical trial at Institut Curie*, InstituteCurie, Editor 2012.
193. Hoffmann-La Roche *A Study of Second-Line Therapy With Tarceva (Erlotinib) in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer*, in NCT02000531 January 2014.
194. AstraZeneca, *Assess the Efficacy, Safety and Tolerability of Gefitinib (Iressa® 250mg) as Maintenance Therapy in Locally Advanced or Metastatic (Stage IIIB/IV) Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC) (INFORM)*, in NCT00770588 September 2008.
195. National Cancer Institute (NCI), *Cytarabine With or Without SCH 900776 in Treating Adult Patients With Relapsed Acute Myeloid Leukemia*, in NCT01870596 May 2013.
196. O'Sullivan, C.C., D.H. Moon, E.C. Kohn, and J.M. Lee, *Beyond Breast and Ovarian Cancers: PARP Inhibitors for BRCA Mutation-Associated and BRCA-Like Solid Tumors*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 42.
197. Crown Human Genome Center, *TOP1*, in *GeneCards1997*, Weizmann Institute of Science in Israel.
198. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων, *Μιτομυκίνη*, Ergobyte Πληροφορική Ανώνυμη Εταιρεία Ανάπτυξης Λογισμικού και Διαδικτυακών Εφαρμογών.
199. Velic, D., A.M. Couturier, M.T. Ferreira, A. Rodrigue, G.G. Poirier, F. Fleury, and J.-Y. Masson, *DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer*. *Biomolecules*, 2015. **5**(4): p. 3204-3259.
200. Anthony JF Griffiths, J.H.M., David T Suzuki, Richard C Lewontin, and William M Gelbart., *Somatic versus germinal mutation*, in *An Introduction to Genetic Analysis*. 2000, W. H. Freeman: New York.
201. Crown Human Genome Center, *CHEK1* in *GeneCards1997*, Weizmann Institute of Science in Israel.
202. Steffen, J.D., J.R. Brody, R.S. Armen, and J.M. Pascal, *Structural Implications for Selective Targeting of PARPs*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 301.
203. Kaufman, B., R. Shapira-Frommer, R.K. Schmutzler, M.W. Audeh, M. Friedlander, J. Balmana, G. Mitchell, G. Fried, S.M. Stemmer, A. Hubert, O. Rosengarten, M. Steiner, N. Loman, K. Bowen, A. Fielding, and S.M. Domchek, *Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(3): p. 244-50.
204. Albarakati, N., T.M.A. Abdel-Fatah, R. Doherty, R. Russell, D. Agarwal, P. Moseley, C. Perry, A. Arora, N. Alsubhi, C. Seedhouse, E.A. Rakha, A. Green, G. Ball, S. Chan, C. Caldas, I.O. Ellis, and S. Madhusudan, *Targeting BRCA1-BER deficient breast cancer by ATM or DNA-PKcs blockade either alone or in combination with cisplatin for personalized therapy*. *Molecular Oncology*, (0).

205. Gene Ontology Consortium, *Gene Ontology Consortium: going forward*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D1049-56.
206. Binns, D., E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O'Donovan, and R. Apweiler, *QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(22): p. 3045-6.
207. Bioinformatics & Evolutionary Genomics. *Calculate and draw custom Venn diagrams*. 2015; Available from: [http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate\\_venn.html](http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html).
208. Forbes, S.A., D. Beare, H. Boutselakis, S. Bamford, N. Bindal, J. Tate, C.G. Cole, S. Ward, E. Dawson, L. Ponting, R. Stefancsik, B. Harsha, C.Y. Kok, M. Jia, H. Jubb, Z. Sondka, S. Thompson, T. De, and P.J. Campbell, *COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(D1): p. D777-D783.
209. Jourquin, J., D. Duncan, Z. Shi, and B. Zhang, *GLAD4U: deriving and prioritizing gene lists from PubMed literature*. *BMC Genomics*, 2012. **13 Suppl 8**: p. S20.
210. Mi, H., S. Poudel, A. Muruganujan, J.T. Casagrande, and P.D. Thomas, *PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(D1): p. D336-42.
211. Hulsen, T., J. de Vlieg, and W. Alkema, *BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 488.
212. Quertle LLC, *Quertle Relationship-driven Biomedical Search, v4.1.1*, 2014, Quertle LLC,,: <http://www.quertle.info>.
213. Safran, M., I. Dalah, J. Alexander, N. Rosen, T. Iny Stein, M. Shmoish, N. Nativ, I. Bahir, T. Doniger, H. Krug, A. Sirota-Madi, T. Olender, Y. Golan, G. Stelzer, A. Harel, and D. Lancet, *GeneCards Version 3: the human gene integrator*. *Database (Oxford)*, 2010. **2010**: p. baq020.
214. Apweiler, R., A. Bairoch, C.H. Wu, W.C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M.J. Martin, D.A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, and L.S. Yeh, *UniProt: the Universal Protein knowledgebase*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D115-9.
215. Maglott, D., J. Ostell, K.D. Pruitt, and T. Tatusova, *Entrez Gene: gene-centered information at NCBI*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Database issue): p. D54-8.
216. Mi, H., B. Lazareva-Ulitsky, R. Loo, A. Kejariwal, J. Vandergriff, S. Rabkin, N. Guo, A. Muruganujan, O. Doremieux, M.J. Campbell, H. Kitano, and P.D. Thomas, *The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Database issue): p. D284-8.
217. Mi, H., X. Huang, A. Muruganujan, H. Tang, C. Mills, D. Kang, and P.D. Thomas, *PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements*. *Nucleic Acids Res*, 2016.
218. Crown Human Genome Center, *FAM175A* in *GeneCards1997*, Weizmann Institute of Science in Israel.
219. Crown Human Genome Center, *BRE*, in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
220. Crown Human Genome Center, *BRCC3* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.

221. Crown Human Genome Center, *BABAM1* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
222. Crown Human Genome Center, *UIMC1* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
223. Crown Human Genome Center, *BRCA1* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
224. Crown Human Genome Center, *BARD1* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
225. Crown Human Genome Center, *NABP1* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
226. Crown Human Genome Center, *NABP2*, in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
227. Crown Human Genome Center, *MRE11A* in *GeneCards2007*, Weizmann Institute of Science in Israel.
228. Moussavi Nik, S.H., L. Wilson, M. Newman, K. Croft, T.A. Mori, I. Musgrave, and M. Lardelli, *The BACE1-PSEN-AbetaPP regulatory axis has an ancient role in response to low oxygen/oxidative stress*. *J Alzheimers Dis*, 2012. **28**(3): p. 515-30.
229. Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K.P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L.J. Jensen, and C. von Mering, *STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D447-52.
230. Pruitt, K.D., T. Tatusova, and D.R. Maglott, *NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Database issue): p. D501-4.
231. Bolser, D.M., D.M. Staines, E. Perry, and P.J. Kersey, *Ensembl Plants: Integrating Tools for Visualizing, Mining, and Analyzing Plant Genomic Data*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1533**: p. 1-31.
232. Kinsella, R.J., A. Kahari, S. Haider, J. Zamora, G. Proctor, G. Spudich, J. Almeida-King, D. Staines, P. Derwent, A. Kerhornou, P. Kersey, and P. Flicek, *Ensembl BioMart: a hub for data retrieval across taxonomic space*. *Database (Oxford)*, 2011. **2011**: p. bar030.
233. Chen, F., A.J. Mackey, C.J. Stoeckert, Jr., and D.S. Roos, *OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Database issue): p. D363-8.
234. Hubbard, T., D. Barker, E. Birney, G. Cameron, Y. Chen, L. Clark, T. Cox, J. Cuff, V. Curwen, T. Down, R. Durbin, E. Eyraas, J. Gilbert, M. Hammond, L. Huminiecki, A. Kasprzyk, H. Lehvaslaiho, P. Lijnzaad, C. Melsopp, E. Mongin, R. Pettett, M. Pocock, S. Potter, A. Rust, E. Schmidt, S. Searle, G. Slater, J. Smith, W. Spooner, A. Stabenau, J. Stalker, E. Stupka, A. Ureta-Vidal, I. Vastrik, and M. Clamp, *The Ensembl genome database project*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(1): p. 38-41.
235. Yates, A., W. Akanni, M.R. Amode, D. Barrell, K. Billis, D. Carvalho-Silva, C. Cummins, P. Clapham, S. Fitzgerald, L. Gil, C.G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S.E. Hunt, S.H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, S. Keenan, I. Lavidas, F.J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D.N. Murphy, R. Nag, M. Nuhn, A. Parker, M. Patricio, M. Pignatelli, M. Rahtz, H.S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S.P. Wilder, A. Zadissa, E. Birney, J. Harrow, M. Muffato, E. Perry, M.

- Ruffier, G. Spudich, S.J. Trevanion, F. Cunningham, B.L. Aken, D.R. Zerbinio, and P. Flicek, *Ensembl 2016*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D710-6.
236. Povey, S., R. Lovering, E. Bruford, M. Wright, M. Lush, and H. Wain, *The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)*. Hum Genet, 2001. **109**(6): p. 678-80.
237. Hedges, S.B., J. Dudley, and S. Kumar, *TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms*. Bioinformatics, 2006. **22**(23): p. 2971-2.
238. Huala, E., A.W. Dickerman, M. Garcia-Hernandez, D. Weems, L. Reiser, F. LaFond, D. Hanley, D. Kiphart, M. Zhuang, W. Huang, L.A. Mueller, D. Bhattacharyya, D. Bhaya, B.W. Sobral, W. Beavis, D.W. Meinke, C.D. Town, C. Somerville, and S.Y. Rhee, *The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 102-5.
239. Zhou, H., G. Randers-Pehrson, C.A. Waldren, D. Vannais, E.J. Hall, and T.K. Hei, *Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2099-104.
240. Zhou, H., M. Suzuki, G. Randers-Pehrson, D. Vannais, G. Chen, J.E. Trosko, C.A. Waldren, and T.K. Hei, *Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14410-5.
241. Wu, L.J., G. Randers-Pehrson, A. Xu, C.A. Waldren, C.R. Geard, Z. Yu, and T.K. Hei, *Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 4959-64.
242. Prise, K.M., O.V. Belyakov, M. Folkard, and B.D. Michael, *Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam*. Int J Radiat Biol, 1998. **74**(6): p. 793-8.
243. Hei, T.K., L.J. Wu, S.X. Liu, D. Vannais, C.A. Waldren, and G. Randers-Pehrson, *Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3765-70.
244. Blyth, B.J. and P.J. Sykes, *Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures?* Radiat Res, 2011. **176**(2): p. 139-57.
245. Chai, Y. and T.K. Hei, *Radiation Induced Bystander Effect in vivo*. Acta Med Nagasaki, 2008. **53**: p. S65-S69.
246. Sawant, S.G., G. Randers-Pehrson, C.R. Geard, D.J. Brenner, and E.J. Hall, *The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells*. Radiat Res, 2001. **155**(3): p. 397-401.
247. Iyer, R., B.E. Lehnert, and R. Svensson, *Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1290-8.
248. Iyer, R. and B.E. Lehnert, *Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells*. Mutat Res, 2002. **503**(1-2): p. 1-9.
249. Mothersill, C., R.J. Seymour, and C.B. Seymour, *Increased radiosensitivity in cells of two human cell lines treated with bystander medium from irradiated repair-deficient cells*. Radiat Res, 2006. **165**(1): p. 26-34.
250. Chaudhry, M.A., *Bystander effect: biological endpoints and microarray analysis*. Mutat Res, 2006. **597**(1-2): p. 98-112.
251. Hei, T.K., *Cyclooxygenase-2 as a signaling molecule in radiation-induced bystander effect*. Mol Carcinog, 2006. **45**(6): p. 455-60.

252. Morgan, W.F., A. Hartmann, C.L. Limoli, S. Nagar, and B. Ponnaiya, *Bystander effects in radiation-induced genomic instability*. *Mutat Res*, 2002. **504**(1-2): p. 91-100.
253. Baskar, R., *Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis*. *Genome Integr*, 2010. **1**(1): p. 13.
254. Hall, E.J. and T.K. Hei, *Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(45): p. 7034-42.
255. Matsumoto, H., A. Takahashi, and T. Ohnishi, *Radiation-induced adaptive responses and bystander effects*. *Biological Sciences in Space*, 2004. **18**: p. 247-254.
256. Little, J.B., *Cellular radiation effects and the bystander response*. *Mutat Res*, 2006. **597**(1-2): p. 113-8.
257. Terzoudi, G.I., C. Donta-Bakoyianni, G. Iliakis, and G.E. Pantelias, *Investigation of bystander effects in hybrid cells by means of cell fusion and premature chromosome condensation induction*. *Radiat Res*, 2010. **173**(6): p. 789-801.
258. Sokolov, M.V. and R.D. Neumann, *Radiation-induced bystander effects in cultured human stem cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e14195.
259. Groesser, T., B. Cooper, and B. Rydberg, *Lack of bystander effects from high-LET radiation for early cytogenetic end points*. *Radiat Res*, 2008. **170**(6): p. 794-802.
260. Nagasawa, H. and J.B. Little, *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles*. *Cancer Res*, 1992. **52**(22): p. 6394-6.
261. Deshpande, A., E.H. Goodwin, S.M. Bailey, B.L. Marrone, and B.E. Lehnert, *Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target*. *Radiat Res*, 1996. **145**(3): p. 260-7.
262. Lorimore, S.A., M.A. Kadhim, D.A. Pocock, D. Papworth, D.L. Stevens, D.T. Goodhead, and E.G. Wright, *Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(10): p. 5730-3.
263. Mothersill, C. and C. Seymour, *Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells*. *Int J Radiat Biol*, 1997. **71**(4): p. 421-7.
264. Seymour, C.B. and C. Mothersill, *Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment*. *Radiat Oncol Investig*, 1997. **5**(3): p. 106-10.
265. Widel, M., *Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested?* *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2012. **66**: p. 828-37.
266. Hatzi, V.I., D.A. Laskaratou, I.V. Mavragani, Z. Nikitaki, A. Mangelis, M.I. Panayiotidis, G.E. Pantelias, G.I. Terzoudi, and A.G. Georgakilas, *Non-targeted radiation effects in vivo: A critical glance of the future in radiobiology*. *Cancer Lett*, 2013.
267. Merrifield, M. and O. Kovalchuk, *Epigenetics in radiation biology: a new research frontier*. *Front Genet*, 2013. **4**: p. 40.
268. Azzam, E.I., S.M. de Toledo, and J.B. Little, *Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(2): p. 473-8.
269. Houghton Mifflin Company, *gap junction*, in *The American Heritage® Medical Dictionary* 2007.

270. Seymour, C.B. and C. Mothersill, *Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve*. *Radiat Res*, 2000. **153**(5 Pt 1): p. 508-11.
271. Lyng, F.M., C.B. Seymour, and C. Mothersill, *Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(9): p. 1223-30.
272. Sedelnikova, O.A., C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, A.G. Georgakilas, and W.M. Bonner, *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. *Mutat. Res.*, 2010. **704**: p. 152-159.
273. Temme, J. and G. Bauer, *Low-dose gamma irradiation enhances superoxide anion production by nonirradiated cells through TGF-beta1-dependent bystander signaling*. *Radiat Res*, 2013. **179**(4): p. 422-32.
274. Nikitaki, Z., I.V. Mavragani, D.A. Laskaratou, V. Gika, V.P. Moskvina, K. Theofilatos, K. Vougas, R.D. Stewart, and A.G. Georgakilas, *Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players*. *Semin Cancer Biol*, 2016. **37-38**: p. 77-95.
275. Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek, *An oncogene-induced DNA damage model for cancer development*. *Science*, 2008. **319**(5868): p. 1352-1355.
276. Sideridou, M., R. Zakopoulou, K. Evangelou, M. Lontos, A. Kotsinas, E. Rampakakis, A.G. Georgakilas, A. Moustakas, and V.G. Gorgoulis, *Cdc6 acts as a "switch" at the E-cadherin locus linking transcriptional repression to activation of replication*. *J. Cell Biol.*, 2011. **195**: p. 1123-1140.
277. Siva, S., M.P. MacManus, R.F. Martin, and O.A. Martin, *Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist*. *Cancer Lett*, 2015. **356**(1): p. 82-90.
278. Mole, R.H., *Whole body irradiation; radiobiology or medicine?* *Br. J. Radiol.*, 1953. **26**: p. 234-241.
279. Large, M., S. Hehlhans, S. Reichert, U.S. Gaipl, C. Fournier, C. Rodel, C. Weiss, and F. Rodel, *Study of the anti-inflammatory effects of low-dose radiation: The contribution of biphasic regulation of the antioxidative system in endothelial cells*. *Strahlenther Onkol*, 2015. **191**(9): p. 742-9.
280. Frey, B., S. Hehlhans, F. Rodel, and U.S. Gaipl, *Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malign diseases*. *Cancer Lett*, 2015. **368**(2): p. 230-7.
281. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(1): p. 27-30.
282. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(1): p. 44-57.
283. Huang, D.W., B.T. Sherman, Q. Tan, J. Kir, D. Liu, D. Bryant, Y. Guo, R. Stephens, M.W. Baseler, H.C. Lane, and R.A. Lempicki, *DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(Web Server issue): p. W169-75.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## A) Γενικά πρωτόκολλα Ανοσοφθορισμού

### A.1 Φροντίδα κυττάρων

#### *Απόψυξη*

Βγάζουμε τα κύτταρα από το υγρό άζωτο ή τους  $-80^{\circ}\text{C}$ , και είτε τα βουτάμε σε λουτρό, είτε τα βάζουμε στον κλίβανο, είτε τα τριβουμε με τα χέρια. Μετά τα βάζουμε στη φλάσκα που περιέχει πλήρες μέσο. Στη μικρή φλάσκα βάζουμε 4 ml πλήρους μέσου και αναδεύουμε με την πιπέτα.

#### *ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ*

Αδειάζουμε το παλιό μέσο από τη φλάσκα, βάζουμε 2-3 ml στείρο PBS και ξεπλένουμε. Αποχύνουμε το PBS και βάζουμε 1-2 ml τρυψίνη, να καλύπτει τα κύτταρα. Τα αφήνουμε στον κλίβανο περίπου 10 min και μετά κάνουμε αναδεύουμε με την πιπέτα μέσα στη φλάσκα για να σπάσουν τα συσσωματώματα. Μοιράζουμε τα κύτταρα στις καινούργιες φλάσκες και προσθέτουμε θρεπτικό μέσο.

#### *PBS*

Σε 500 ml στείρο (έτοιμο) PBS προσθέτουμε 5 ml αντιβιοτικό Penicillin/Streptomycin, Biochrom.

#### *ΠΛΗΡΕΣ ΜΕΣΟ*

500 ml RPMI ή D-MEM ή McCoy's  
50 ml FBS  
5 ml αντιβιοτικό  
5 ml L glutamine (βοηθά στον πολλαπλασιασμό)

#### *ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΠΛΑΚΩΝ*

Απλώνουμε τα πλακάκια που θα χρειαστούμε στον απαγωγό, και χρησιμοποιώντας μια μικρή καλυπτρίδα μαρκάρουμε γύρω της μια περιοχή με τον υδρόφοβο μαρκαδόρο.

Στη συνέχεια βουτάμε τα πλακάκια πλάτη με πλάτη στο δοχείο με την αιθανόλη και αφήνουμε για 15 min.

Βάζουμε σε κάθε τρυβλίο ένα πλακάκι, μισοκλείνουμε με το καπάκι του και περιμένουμε να στεγνώσει η αιθανόλη. Εντωμεταξύ χειριζόμαστε τα κύτταρα.

Στα κύτταρα που βρίσκονται σε εनावώρημα τρυψίνης προσθέτουμε λίγο μέσο και αναδεύουμε με την πιπέτα.

Στη συνέχεια παίρνουμε 800 μl από το διάλυμα κυττάρων-τροψίνης-πλήρους μέσου και τα βάζουμε σε ένα πλακάκι. Επαναλαμβάνουμε για όλα τα πλακάκια. Τα 800 μl επιλέχτηκαν ως τη μέγιστη ποσότητα που μπορεί να συγκρατήσει ο υδρόφοβος, δηλαδή η σταγόνα είναι όσο το δυνατόν πιο παχιά, να μην κινδυνεύει όμως να σπάσει και να χυθεί.

Στη συνέχεια βάζουμε τα τρυβλία προσεχτικά, στον κλίβανο. Μετά την πάροδο λίγων ωρών, τα κύτταρα θα έχουν κολλήσει στο πλακάκι, επομένως θα μπορέσουμε άφοβα να συμπληρώσουμε με θρεπτικό μέσο, τουλάχιστον τόσο όσο να καλύπτονται πλήρως τα κύτταρα.

### *ΧΡΩΣΗ GIEMSA*

Πρόκειται για την απλή χρώση η οποία επισημαίνει χρωμοσωματικές αλλοιώσεις όπως δικεντρικά χρωμοσώματα, δακτύλιους και θραύσεις.

Γεμίζουμε την ειδική θήκη με Sørensen και προσθέτουμε 2 ml από το πυκνό μωβ διάλυμα με τη σύριγγα. Η συγκέντρωση είναι περίπου 2%.

Βυθίζουμε τα πλακάκια πλάτη με πλάτη, τα κολυμπάμε λίγο, τα βάζουμε στις χαραγές και τα αφήνουμε 5 min.

Τα βγάζουμε με μία λαβίδα ένα-ένα και τα ξεπλένουμε με νερό βρύσης σε μικρή ροή για να μη φύγουν τα κύτταρα. Τα περνάμε από λουτρό με αποσταγμένο και τα αφήνουμε να στεγνώσουν στην ειδική θήκη.

Στη συνέχεια βάζουμε τη διαφανή κόλλα και τις καλυπτρίδες.

Για να φτιάξουμε το Sørensen διαλύουμε μία ταμπλέτα (τις έχει ο Παναγιώτης) σε 1 lt αποσταγμένο νερό.

## **A.2 Ανοσοφθορισμός σε λεμφοκύτταρα**

### *Ly isolation*

#### Biocoll Separating Solution

If we have 4 ml of blood, firstly we put 2 ml ficoll in each of the two tubes. (blood: ficoll = 1:1)

We reach gently the surface of the ficoll and drop a little bit ficoll till we have a thin film of blood on the ficoll surface. Then we lift the pipette a little and empty the rest of the blood very slowly. It is better if we hold the tube angled. Avoid the mix of blood and ficoll.

Centrifuge 20 min , 1800 rpm, 35 ° C, acceleration= deceleration = 1



- Aspirate the supernatant
- Collect the lymphocytes, avoiding to collect any ficoll
- In two new tubes divide the cells
- add full medium till up
- pipetting

Rinse by centrifugation:

Rinse - centrifugation

1500 rpm, 15 min , acceleration= deceleration = 1.

reject the supernatant and Gently tap with the finger the bottom of the tube in order to split up the cells.

Add 3 ml of full medium in each of the two tubes, mix by tapping with the finger. Add all the cells in one tube and then divide the cells in three tubes.

### **Irradiation on ice**

Now the cells are divided in three tubes with 2 ml of full medium.

0 Gy 0.5 Gy 1 Gy

### **Incubation for 20 min at 37 C**

The cells are still in the tubes with full medium

### **Centrifugation 10 min 1400 rpm**

We centrifuge to separate the cells in order to Immerse them into the hypotonic solution.

**Hypotonic** Reject the supernatant, tap the tube to separate the cells, add gently some hypotonic and tap, repeat till the tube is full of hypotonic.

Hypotonic= 75 mM KCl in distilled water

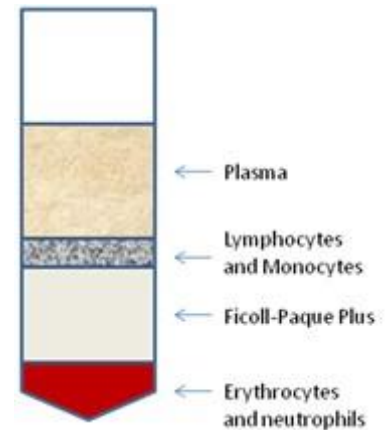
### **Centrifugation 10 min 1300 rpm**

Reject the supernatant and add 2ml of hypotonic again in each tube. Mix.

**Seed the cells on the slides** For each slide add 200 µl of the solution which contains the cells.

*Centrifugation* 800 rpm 4 min 200 µl

Check on microscope the density of the cells. You need the cells to be quite close to each other, but not overlapping.



## **Fixation**

Immerse the slides into a jar containing paraformaldehyde 4% for 15 min.

## **PBS rinsing**

Into a new jar containing PBS immerse the slides. Each wash may last 5 min. Wash onto the orbital shaker (70 rounds/min). Repeat other two times

**Triton x rinsing** 0.1 % triton-x100 in PBS . 3 x 5 min. Orbital shaker

*PBS* Rinse once again with PBS for 5 min.

## **Blocking**

Composition: 10 % BSA , 6% FBS, 0.02 % Triton X.

spread a sheet of filter paper moistened with distilled water *onto a surface and put on it the slides*. Wipe the slides without touching the cell area. With a hydrophobic pen draw a circle around the cells. Add 200 µl of blocking solution in each slide. Incubate for 45 min.

**45 min incubation** After 45 min of incubation :

**Addition of primary antibody  $\gamma$ -H2AX 1h incubator** Dilution 1:1000

Remove the liquid of the slides very carefully, using filtering paper. Avoid to touch the cells.

Right after add 200 µl of primary ab in each slide. Put the slides into the incubator for 1 hour.

## **Ξέπλυμα με PBS rinsing**

Wash three times with PBS onto the orbital shaker.

In a jar containing fresh PBS the cells can wait overnight into the refrigerator. If you want you can run the whole the protocol in one day.

@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@

## **Second day**

*1x 5 min PBS*

## **Blocking**

Incubate for 1 h with blocking solution

*2<sup>ry</sup> antibody* Dilution 1:4000 in blocking solution.

Add 200 µl in each slide. Secondary ab is photosensitive so we work in the dark.

**Incubation 30 min** Incubate for 30 min

*PBS* 3x5min orbital shaker

**Ethanol** Let the cell to dry out and immerse into a jar containing 100% ice cold ethanol for 15 min. Let them dry out from ethanol for at least 30min. If you have time let them dryout overnight IN DARK.

**Dapi** Drop on little drop of dapi in each slide. Add the coverslips.

### A.3 Γενικό πρωτόκολλο για συνεστιακό μικροσκόπιο

#### **Fixation**

- ✚ Remove medium
- ✚ wash once with PBS pH 7.4
- ✚ transfer slide in new dish (35mm dish) containing 2ml of 2% PFA and incubate for 15min at room temperature
- ✚ trypsinize the cells in the remaining dish (use 200μl, 0.05% Trypsin)
- ✚ collect the cells in 1ml medium
- ✚ fix the cells in 70% ethanol for FAQS

#### **Permeabilization**

- ✚ remove PFA
- ✚ wash once with PBS
- ✚ add 2ml of P-Solution and incubate for 5min an Room Temperature  
if the aimed protein is abundant and we want to get rid of, we leave the cells for 10min in P-solution. If we wish to keep the whole information we leave for 5min.

#### **Blocking**

- ✚ remove P-solution
- ✚ wash once with PBS
- ✚ add 2ml of PBG and incubate for at least 1h at RT. It is preferable to incubate overnight at 4°C

#### **Incubation with primary Ab**

- ✚ Dilute antibody in PBG (for this experiment on all the dilutions of primary Abs are 1:400, unless it is declared).
- ✚ Give 100μl of Ab-solution per coverslip on a piece of parafilm and place the coverslip (with cells towards the antibody) on the liquid, avoid air bubbles
- ✚ Incubate for 1.5h at RT
- ✚ Wash 3 times for 5min in PBS (with coverslips in the dishes-softly shaking)

#### **Incubation with secondary antibody**

- ✚ See 1<sup>ry</sup> antibody, but keep samples on dark
- ✚ Incubate for about 1h at RT
- ✚ Wash 3 times as described above

#### **DAPI staining**

- ✚ Give 2drops of 18μl of DAPI-antifade solution to the slide and add 2 coverslips

- ✚ Store at RT IN DARK until anti-fade solidify  
wait until anti-fade is solid before starting the microscopy work
- ✚ Store up to 6 months at 4°C in dark box

## A.4 Πρωτόκολλο του ερευνητή Asaithamby

### Cultivation

1. Grow 100.000 HT1080 cells on a 22x22 cover glass for 36-48h
2. Make sure that the cells are healthy and are 70% confluent  
We used A549 cells a bit more confluent

### Fixation

3. Different times after irradiation/treatment wash the cells two times with 1xPBS at room temperature
4. Fix the cells with 4% PFA (in 1xPBS, pH 7.4) for 20min RT (we forgot to check pH.)
5. Wash the cells three times with 1xPBS (5-10min interval) at RT.

### Permeabilization

6. Incubate the cells in 0.5% Triton-X100 in PBS (ice cold) on ice for 10min.
7. Wash the cells three times with 1xPBS

### Blocking

8. Incubate the cells in blocking solution (5% Normal goat serum in 1xPBS) for 60min at RT (normal goat serum from Jackson Laboratories)

### Incubation with primary Ab

9. Dilute rabbit anti-OGG1 (Novus Biologicals Cat#100-106; 1:500) in 5% goat serum and incubate the cells in primary antibody for 4h RT
10. Wash the cells three times with wash buffer (1% BSA in 1xPBS; 5min interval between washes).

### Incubation with secondary antibody

11. Incubate the cells in secondary Ab diluted in 1% BSA, 2.5% goat serum in 1xPBS, for 1h (Molecular Probes dilution of 1:1000)
12. Wash the cells five times with wash buffer (1% BSA in 1xPBS; 5min interval between washes).

### DAPI staining

13. After the last wash, remove the wash buffer completely and let the cells to dry (5-10min)
14. Mount the cover glass with vectasheild mounting medium DAPI.  
We stained according to Emil's staining without drying them out.

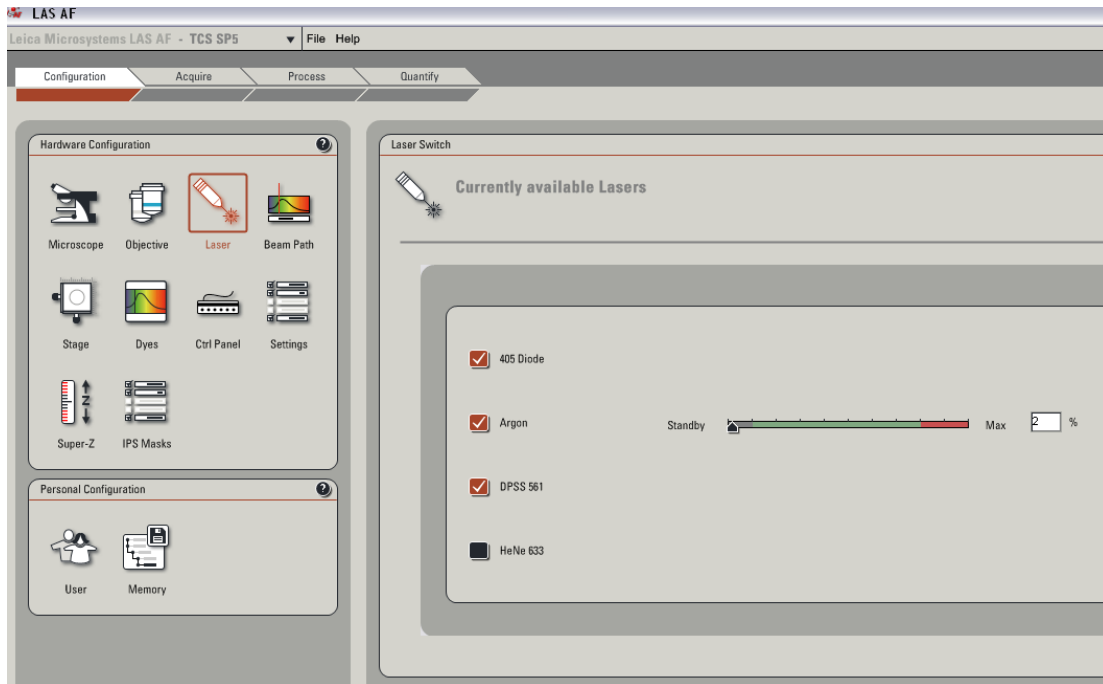
## A.5 Απεικόνιση με το συνθεσιακό μικροσκόπιο LEICA SP5

### IMAGINING with LEICA's Confocal

Vladimir

#### How to turn on the microscope:

- Turn on the first and the third of the three green buttons. And wait 1min
- Then press the second.
- From Leica's software turn on the lasers:



#### Configuration/laser

- ✓ 405 Diode UV (for Dapi)
- ✓ Argon 5 koryfes 488 (green)
- ✓ DPSS 561 (orange)
- HeNe 633 (infrared)

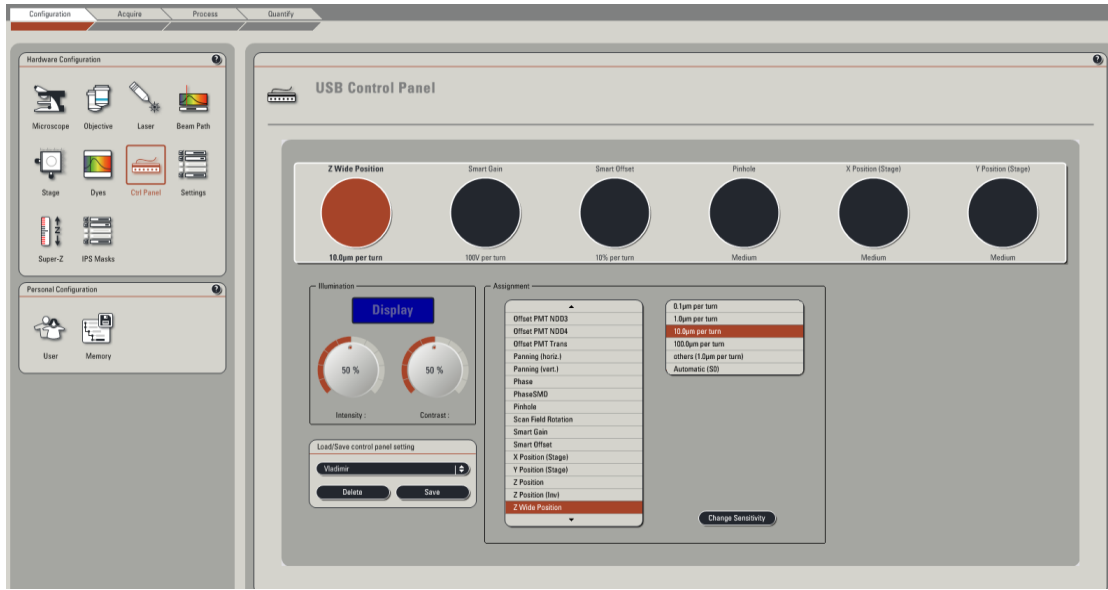
Set the Argon power control to 2%

Turn on the mercury lamp (for epifluorescent mode).

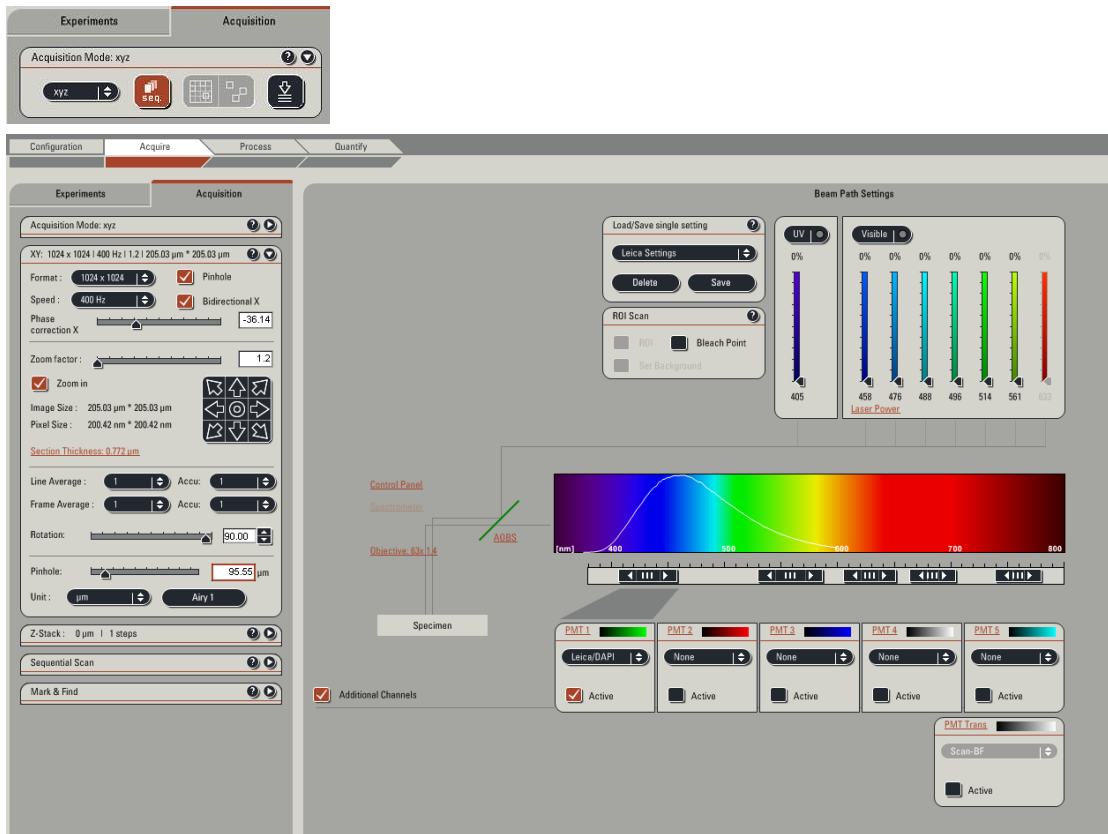
Wait for 15-20 min for the lasers and the mercury lamp to warm up.

#### How to begin

Ctrl panel → Vladimir's settings



Acquisition > Mode = xyz Sequential scanning= enable.



☐ Same stack for all

xy : 1024x1024  
400Hz

- pinhole
- bidirectional x

that means that it is scanning while it travels towards both to -x and +x.

phase correction align -36.14

Zoom = 1.2

pixel size is given from above settings as 200.42nm x 200.42nm

Image size 205.03µm x 205.03µm.

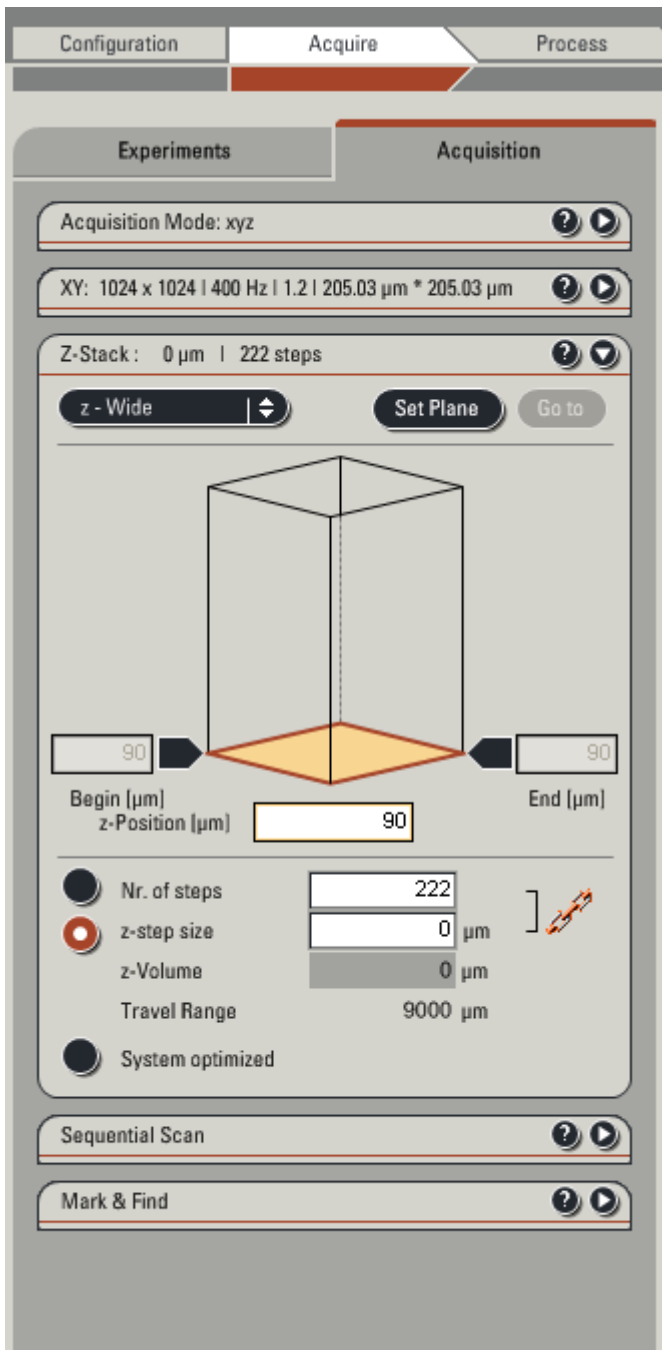
Line average 1

Accumulation 1

in case of high background  
in case of weak signal

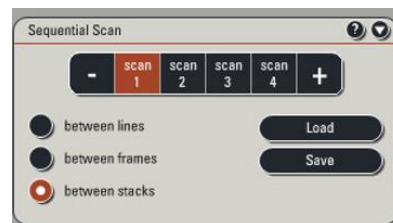
Rotation 90.0

pinhole = 95.55µm



z-stack  
set as: z-wide

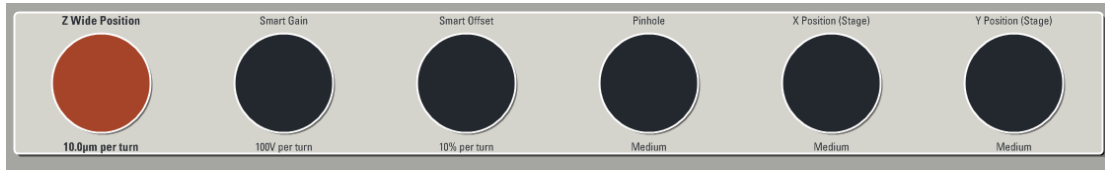
After the first capture, stop live imaging and set the "z-step size" as 0.5µm. It automatically turns into 0.49, but it is still ok.



You can save your settings from one specific experiment, and to reload them later...

Show mark and find panel





The first button is to travel towards the Z axis.

The second, *Smart Gain*, modulates the sensitivity of the detector. When we are looking for foci, from this channel we set the live imaging to show the “temperature” of the color (upper icon-right panel). In order to set properly our *sequential scan profile*, we increase the *smart gain* till the majority of foci turns to red. We stop increasing when some foci turn to blue. Blue means oversaturation.

*Smart offset* is a kind of threshold. Deletes the pixels that have less luminosity than the value it is referred to. We use this parameter on its negative values. So let’s say -12% is a more strict criterion than -2%.

So we increase (make stricter) the *smart offset* till we get rid of the black spots in the background.

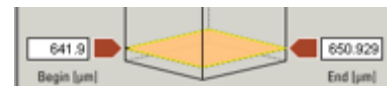
In order to capture nicely the dapi, we need nuclei to be depicted as orange and to have well defined edges, no background. No background we wave when the surroundings are green.

When we save a *sequential scan* profile, it saves for each channel the corresponding settings.

### How to capture and scan

Go to mark and find panel and use the epifluorescent mode. Capture 5 optical fields per coverslip and go to live (confocal). If cells are not enough dense per optical field, make more captures.

For each field set first the lower and then the upper position of z-stack., by using the first button of the abovementioned panel. When it is clicked it turns to orange. If you wish to change a little the optical field you can use the 5<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> button. If you do so you have also to press the redefine settings except of the save. After you finish with all optical fields of the slide you stop live mode and press start.



When scanning finishes you have to save the images.

Go back to Experiments, create as many folders as your optical fields, put one set of images to one folder, rename one by one and press save all.

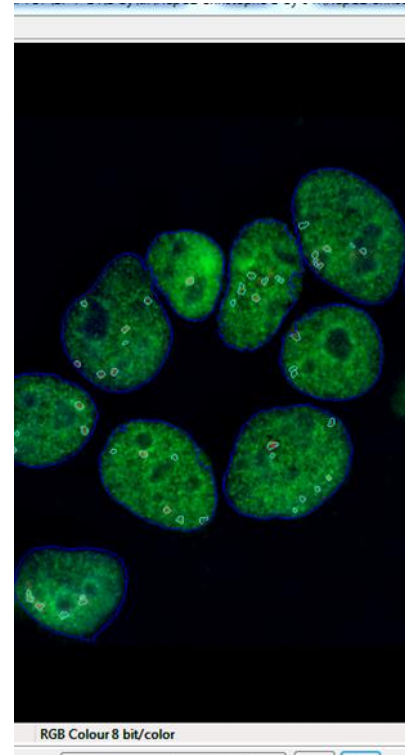
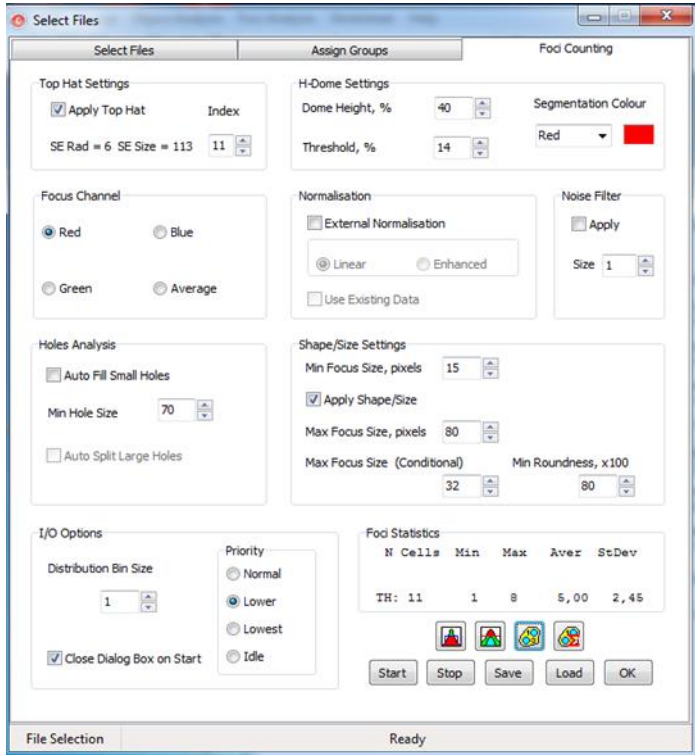
### How to switch of the microscope.

Firstly turn of the lasers from the software (configuration\settings\ unclick) and also the UV-lamp. Turn of the computer and wait for at least 10min. Then switch of the 3 green buttons and also the key.

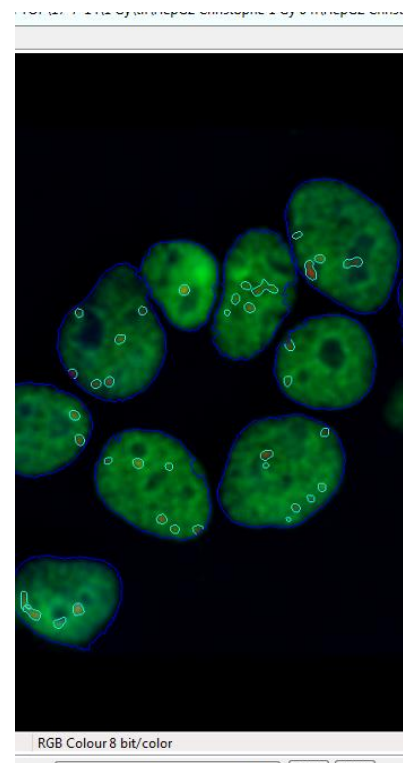
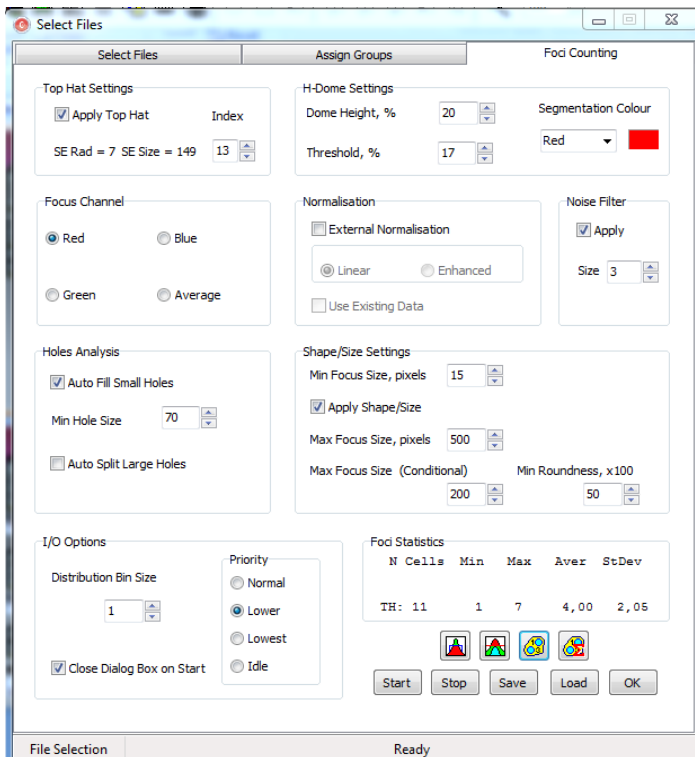
## A.6 Ανάλυση με το λογισμικό Jcount (5.4.2)

Παράμετροι στο Jcount ώστε:

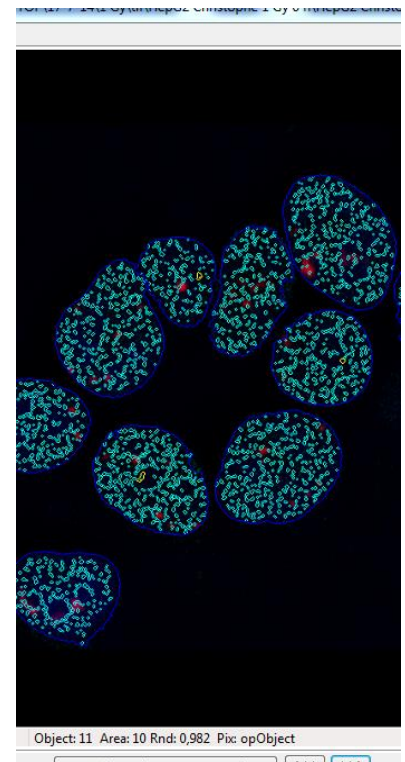
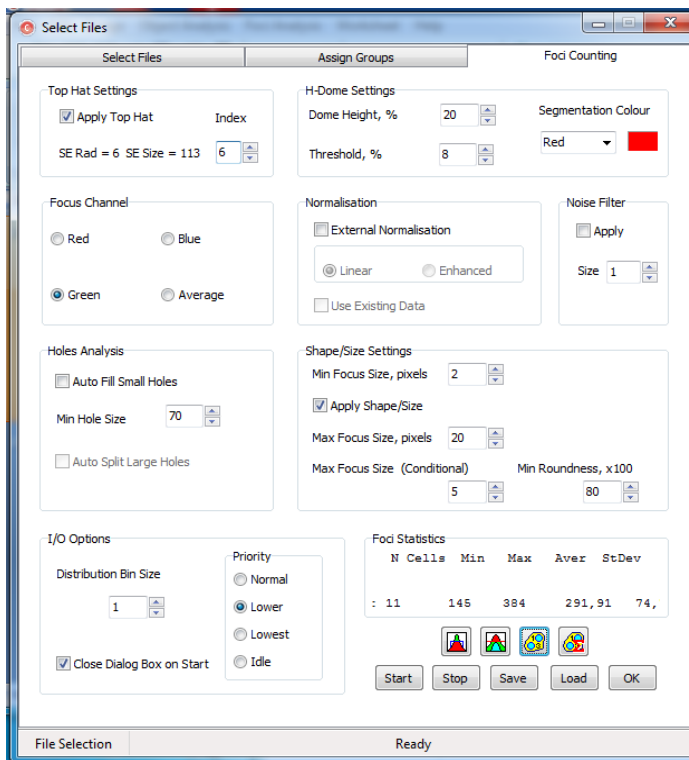
- 1) Να γίνει σωστή καταμέτρηση των εστιών  $\gamma$ -H2AX



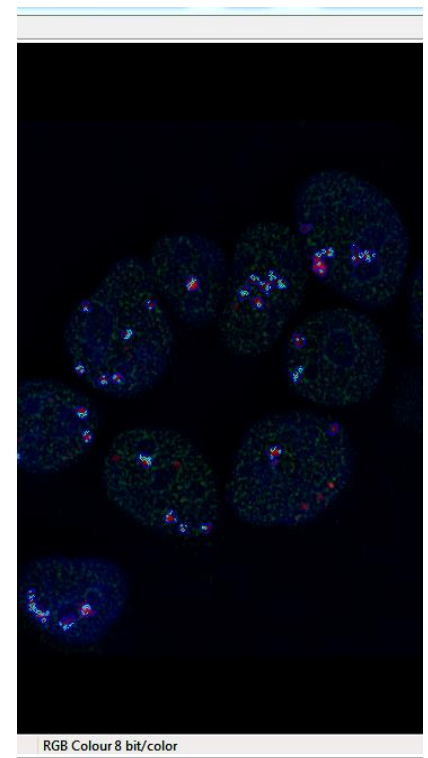
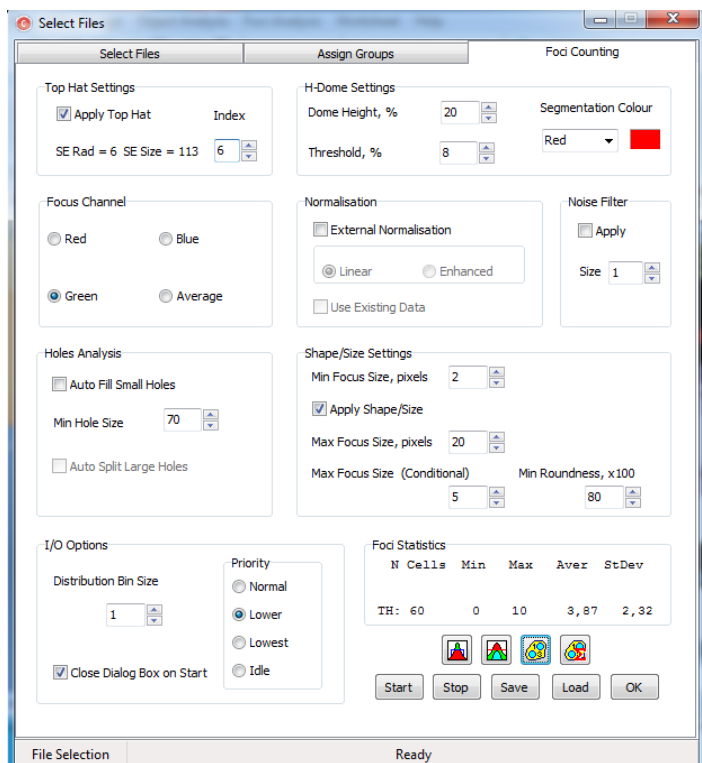
- 2) Να οριστούν οι μεγάλες εστιές  $\gamma$ -H2AX που θα αποτελέσουν την επιφάνεια καταμέτρησης των εστιών APE1



3) Να καταμετρηθούν οι εστίες APE1 ανά κύτταρο



4) Να καταμετρηθούν οι εστίες APE1 ανά μεγάλη εστία γ-H2AX



## B) Λίστες γονιδίων

### B.1 Γονίδια που συμμετέχουν στους 5 βασικούς μηχανισμούς Επιδιόρθωσης του DNA

<b>BER</b>	<b>NER</b>	<b>MMR</b>	<b>HR</b>	<b>NHEJ</b>
APEX1	AQR	ABL1	AP5S1	ATM
APEX2	ATXN3	AXIN2	AP5Z1	ATP23
CCNO	BIVM	ERCC1	ATM	BABAM1
DNA2	BIVM-ERCC5	EXO1	BLM	BARD1
ERCC6	BRCA2	HMGB1	BRCA1	BRCA1
FAM168A	CCNH	LIG1	BRCA2	BRCC3
FEN1	CDK7	MLH1	CCDC155	BRE
HMGA2	CETN2	MLH3	CDC45	C7orf49
HMGB1	CHD1L	MSH2	CDC7	C9orf142
HUWE1	COPS2	MSH3	CHEK1	DCLRE1A
LIG1	COPS3	MSH4	DMC1	DCLRE1B
LIG3	COPS4	MSH5	ERCC4	DCLRE1C
MBD4	COPS5	MSH5-SAPCD1	EXD2	DEK
MPG	COPS6	MSH6	FAN1	FAM175A
MUTYH	COPS7A	MUTYH	FBXO18	H2AFX
NEIL1	COPS7B	PCNA	FEN1	HERC2
NEIL2	COPS8	PMS1	FIGN	HIST1H4A
NEIL3	CUL4A	PMS2	FIGNL1	HIST1H4B
NTHL1	CUL4B	POLD1	GEN1	HIST1H4C
OGG1	DDB1	POLD2	GINS2	HIST1H4D
PARP2	DDB2	POLD3	GINS4	HIST1H4E
POLB	EP300	POLD4	H2AFX	HIST1H4F
POLD1	ERCC1	PRKCG	HELB	HIST1H4H
POLE	ERCC2	RNASEH2A	HELQ	HIST1H4I
POLG	ERCC3	RPA1	HUS1	HIST1H4J
POLQ	ERCC4	RPA2	HUS1B	HIST1H4K
PRMT6	ERCC5	RPA3	INO80	HIST1H4L
RPA1	ERCC6	SETD2	KDM1A	HIST2H4A
RPA2	ERCC8	TDG	KDM4D	HIST2H4B
RPA3	FAN1	TP73	LIG3	HIST3H3
RPS3	FANCC	TREX1	MCM8	HIST4H4
SIRT6	GPS1	XPC	MCM9	HMG20A
SMUG1	GTF2H1		MEIOB	HMGA2
TDG	GTF2H2		MMS22L	KAT5
TP53	GTF2H2C		MORF4L1	KDM2A
UNG	GTF2H2C_2		MRE11	KDM4D
USP47	GTF2H3		NABP1	LIG4
WRN	GTF2H4		NABP2	MDC1
XPA	GTF2H5		NBN	MLH1
XRCC1	HMGB1		NSMCE1	MRE11
	HMGN1		NSMCE2	NBN
	HUS1		NUCKS1	NHEJ1
	HUS1B		PALB2	NSMCE2
	ISY1		PARP1	PAXIP1
	LIG1		PARPBP	PIAS4
	LIG3		POLN	POLA1
	LIG4		POLQ	POLL
	MMS19		PPP4C	POLM
	MNAT1		PPP4R2	POLQ

NEIL1	PSMD14	PRKDC
NEIL2	RAD21L1	PRPF19
NEIL3	RAD50	PSMD14
NTHL1	RAD51	RAD50
OGG1	RAD51AP1	RIF1
PARP1	RAD51B	RNF168
PCNA	RAD51C	RNF8
PNKP	RAD51D	SETMAR
POLB	RAD52	SMC5
POLD1	RAD54B	SUMO1
POLD2	RAD54L	TFIP11
POLD3	RBBP8	TP53BP1
POLD4	REC8	UBE2N
POLE	RECQL	UBE2V2
POLK	RECQL5	UIMC1
POLL	RNF138	UVRAG
POLR2A	RPA1	WHSC1
POLR2B	RPA2	XRCC4
POLR2C	RPA3	XRCC5
POLR2D	RTEL1	XRCC6
POLR2E	RTEL1-TNFRSF6B	
POLR2F	SFPQ	
POLR2G	SFR1	
POLR2H	SHFM1	
POLR2I	SIRT6	
POLR2J	SLX1A	
POLR2K	SLX1B	
POLR2L	SLX4	
PPIE	SMC5	
PRPF19	SMC6	
RAD23A	SPIDR	
RAD23B	SWI5	
RAD51D	SWSAP1	
RAD52	TERF2IP	
RBBP8	TEX15	
RBX1	TONSL	
RFC1	UBE2N	
RFC2	WDR48	
RFC3	XRCC1	
RFC4	XRCC2	
RFC5	XRCC3	
RNF111	YY1	
RPA1	ZFYVE26	
RPA2	ZSWIM7	
RPA3		
RPA4		
RPS27A		
SIRT1		
SLC30A9		
SLX4		
SUMO1		
SUMO2		
SUMO3		
TCEA1		
TP53		

UBA52  
UBB  
UBC  
UBE2I  
UBE2N  
UBE2V2  
USP45  
USP7  
UVSSA  
XAB2  
XPA  
XPC  
XRCC1  
ZNF830

## Γ) Λεπτομέρειες βιοπληροφορικής ανάλυσης

### Γ.1 Για την ανάδειξη της προέλευσης βλαβών DNA (7.1)

#### GLAD4U - Vanderbilt University

Department of Biomedical Informatics - <http://bioinfo.vanderbilt.edu/glad4u>

[Home](#) | [News/Updates](#) | [Documentation](#) | [Contact Us](#)  [Search](#)  [Ticket](#)

number: lu7gr9sebma9i8jgue8tacjf70

---

Summary    


**Generated on:** January 4, 2015

**Query:** DNA repair and replication stress (Parameters used: threshold of 0.01, search only human genes, 100 genes per page, 10 publications per gene, 5 page links per page)

**Number of publications retrieved:** 1,123

**Number of publications containing gene information (among the 1,123):** 219

**Number of genes in these 219 publications:** 351

**Number of genes after the score threshold:** 88 

Send data to [Functional Enrichment Analysis](#) (opens a new window)


Visualize genes in [a protein-protein interaction network](#)

---

Genes identified in your query, from highest to lowest scores:

*(all links will open in new windows)*

**Expand all publications** 

1. ATR - ATR serine/threonine kinase[*Homo sapiens*, Entrez-Gene ID:545]  
score: 70.4519, [go to Entrez-Gene page](#), show the first 10 out of the 36 supporting publications 

In order to make **SI Table 1a** we combine the .tsv (tab separated values) files that arise from

Summary third button as shown from the original procedure: **Summary**    and [Functional Enrichment Analysis](#) > [Export TSV Only](#) in an excel sheet.

We keep only the genes with score higher than 10.

By the same way **SI Table 1b** and **SI Table 1c** were created.

SI Table 1a		SI Table 1b		SI Table 1c	
Query: "DNA repair and replication stress"		Query: "replication stress and DNA repair"		Query: "replication stress and DNA damage response"	
score	Gene	score	Gene	score	Gene
70.4519	<i>ATR</i>	70.4519	<i>ATR</i>	113.550027	<i>ATR</i>
26.893342	<i>ATRIP</i>	26.893342	<i>ATRIP</i>	48.339535	<i>CHEK1</i>
22.541925	<i>ATM</i>	22.541925	<i>ATM</i>	42.519784	<i>ATM</i>
16.968437	<i>H2AFX</i>	16.968437	<i>H2AFX</i>	32.409262	<i>CLSPN</i>
16.757653	<i>RPA2</i>	16.757653	<i>RPA2</i>	28.960509	<i>ATRIP</i>
14.280454	<i>BLM</i>	14.280454	<i>BLM</i>	23.842135	<i>RPA1</i>
13.741887	<i>WRN</i>	13.741887	<i>WRN</i>	20.822734	<i>RPA2</i>
12.281905	<i>RPA1</i>	12.281905	<i>RPA1</i>	15.62232	<i>SMARCAL1</i>
11.972673	<i>RAD17</i>	11.972673	<i>RAD17</i>	14.036702	<i>RAD17</i>
10.804183	<i>CHEK1</i>	10.804183	<i>CHEK1</i>	13.855259	<i>BLM</i>
10.324581	<i>FANCM</i>	10.324581	<i>FANCM</i>	13.317429	<i>WRN</i>
				12.777728	<i>H2AFX</i>
				11.447121	<i>CDC25A</i>
				10.545647	<i>RAD9A</i>
				10.253159	<i>NBN</i>

### Unifying data

After unifying the above three tables, **SI Table 1d** is produced.

Then, we make again the prioritization according to the score and we delete the duplicates.


**SI Table 1e** is the resulted table for 'Replication Stress' part of **Table II**.



<b>SI Table 1d</b>		<b>SI Table 1e</b>	
<b>REPLICATION STRESS</b>		<b>REPLICATION STRESS</b>	
<b>score</b>	<b>Gene</b>	<b>score</b>	<b>Gene</b>
113.550027	<i>ATR</i>	113.550027	<i>ATR</i>
48.339535	<i>CHEK1</i>	48.339535	<i>CHEK1</i>
42.519784	<i>ATM</i>	42.519784	<i>ATM</i>
32.409262	<i>CLSPN</i>	32.409262	<i>CLSPN</i>
28.960509	<i>ATRIP</i>	28.960509	<i>ATRIP</i>
23.842135	<i>RPA1</i>	23.842135	<i>RPA1</i>
20.822734	<i>RPA2</i>	20.822734	<i>RPA2</i>
15.62232	<i>SMARCAL1</i>	16.968437	<i>H2AFX</i>
14.036702	<i>RAD17</i>	15.62232	<i>SMARCAL1</i>
13.855259	<i>BLM</i>	14.280454	<i>BLM</i>
13.317429	<i>WRN</i>	14.036702	<i>RAD17</i>
12.777728	<i>H2AFX</i>	13.741887	<i>WRN</i>
11.447121	<i>CDC25A</i>	11.447121	<i>CDC25A</i>
10.545647	<i>RAD9A</i>	10.545647	<i>RAD9A</i>
10.253159	<i>NBN</i>	10.324581	<i>FANCM</i>
70.4519	<i>ATR</i>	10.253159	<i>NBN</i>
26.893342	<i>ATRIP</i>		
22.541925	<i>ATM</i>		
16.968437	<i>H2AFX</i>		
16.757653	<i>RPA2</i>		
14.280454	<i>BLM</i>		
13.741887	<i>WRN</i>		
12.281905	<i>RPA1</i>		
11.972673	<i>RAD17</i>		
10.804183	<i>CHEK1</i>		
10.324581	<i>FANCM</i>		

### Related publications

If the reader wishes to have access to all publications that are related to abovementioned genes, he/she could go to GLAD4U homepage, insert the ticket number provided above and then to press

*Expand all publications* .

### The other two sets of Table II data

By repeating with similar way the steps 1.1.2 and 1.1.3 the rest of **Table II** was created.

#### ○ *Creation of Table I*

In order to create **Table I** we began with another approach. We begin with the input “DNA repair” in AmiGO2.

## AmiGO2

[AmiGO2](http://www.geneontology.org) is a browser of Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO; <http://www.geneontology.org>) is a community-based bioinformatics resource that supplies information about gene product function using ontologies to represent biological knowledge. The Gene Ontology Consortium (GOC) has expanded areas of the ontology such as cilia-related terms, cell-cycle terms and multicellular organism processes. It is also implemented with new tools for generating ontology terms based on a set of logical rules making use of templates. The GOC web site summarizes developments and documentation, serving as a portal to GO data. User can perform GO enrichment analysis, and search the GO for terms, annotations to gene products, and associated metadata across multiple species using the AmiGO 2 browser [205].

### **“DNA repair” brunch of Table I**

#### **Applying filters step by step for “DNA repair AND ionizing radiation”**

We show here how the results are being confined as we add extra filters.

If we begin with

[http://amigo.geneontology.org/amigo/medial\\_search?q=DNA+repair](http://amigo.geneontology.org/amigo/medial_search?q=DNA+repair)

> Genes and gene products

It results with 12750 found entities.

Then we add the first filter

> taxon = homo sapiens → at this moment we have 867 genes

Then one more filter

> Direct annotation = DNA repair → 590 genes

And one more

> Direct annotation = Response to ionizing radiation → 14 genes

Now we remove the above filter and add this one

> Direct annotation = Cellular response to ionizing radiation → 2 genes, but these two are already included in above mentioned 14 genes.

#### **Applying filters for “oxidative stress” and also for “replication stress”**

By this first screen we have a first estimation to the term

DNA repair AND ionizing radiation.

We repeat 1.2.2.1 steps also for

- a) “Oxidative stress” and b) “replication stress”.

## **“DNA damage response” brunch of Table I**

We run the steps explained above (1.2.2) for DNA damage response

For a) ionizing radiation, b) replication stress and c) replication stress.

### **Exclusion of common genes among the categories**

At this time we have six times run the process.

We have results for:

- 1) DNA repair  $\cap$  ionizing radiation
- 2) DNA repair  $\cap$  oxidative stress
- 3) DNA repair  $\cap$  replication stress
- 4) DNA damage response  $\cap$  ionizing radiation
- 5) DNA damage response  $\cap$  oxidative stress
- 6) DNA damage response  $\cap$  replication stress

Now is the time to unify 1) & 3) & the corresponding column from table II (IONIZING RADIATION).

Accordingly: 2) & 4) & the corresponding column from table II (OXIDATIVE STRESS).

And also: 3) & 6) & the corresponding column from table II (REPLICATION STRESS).

For each one of our new sets we delete the duplicates.

And finally we are interested in ONLY UNIQUE genes. So we use BioVenn [211] and for each set we keep only the genes that are not common with genes of any of the other two sets.

BioVenn: As it clarifies in its home page, is a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams.<sup>i</sup> It accepts as inputs up to 3 lists (x,y,z) of data and compares for common terms. It calculates the number of co-existence for each combination  $x \cap (y \cup z)$ ,  $y \cap (x \cup z)$ ,  $z \cap (x \cup y)$ ,  $x \cap y \cap z$ ,  $x \cap z \cap y$ ,  $y \cap z \cap x$ ,  $x \cap y \cap z$  and makes the representation. The user can retrieve the subsets that are created.

We also have to refer that for this step we could followed many other approaches instead of BioVenn.

### **This is the end of automated treating.**

After all these steps, manual treatment was performed as it is described in the main text.

- a) **One step further: Testing our results by STRING v.10**

Aiming to enhance the significance of our results towards the ‘uniqueness’ of the biomarkers found in each category, we used our data of **Table I** as input into STRING v.10, in order to investigate if there are any interactions among the genes through the three classifications. The results based on experimental evidence show no interaction among the proteins of each group with another (no intergroup association).

○ *STRING v.10*

STRING database (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (<http://string-db.org>) provides a critical representation of protein-protein interactions, including direct (physical) as well as indirect (functional) associations [229].

Parameters:

- Organism: homo sapiens
- Active prediction methods: only experiments (among the available that were neighborhood, gene fusion, co-occurrence, experiments, databases, text mining)
- Level of confidence: 0.700