



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών  
Τομέας Φυσικής  
Εργαστήριο Βλαβών DNA

## Διπλωματική εργασία

« Ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA μέσω της μεθόδου συνεντοπισμού επιδιορθωτικών πρωτεϊνών PclC»

### Μακρή Αντιγόνη Ζαχαρούλα



Επιβλέπων:  
Αναπλ. Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Αθήνα, 2019



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

« Ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA μέσω της μεθόδου  
συνεντοπισμού επιδιορθωτικών πρωτεϊνών PclC»

Διπλωματική εργασία  
της  
Μακρή Αντιγόνης Ζαχαρούλας

Επιβλέπων: Αναπλ. καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την Πέμπτη, 28 Μαρτίου 2019

.....

Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Αναπλ. Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....

Μυρσίνη Μακροπούλου

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

.....

Μιχαήλ Κόκκορης

Αναπλ. Καθηγητής Ε.Μ.Π

# Περίληψη

Οι δίκλωνες θραύσεις (ΔΚΘ) αποτελούν τις πιο επικίνδυνες βλάβες που υφίσταται βιολογικά το DNA, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια μεγάλου τμήματος του γονιδίου και άρα σε μεταλλάξεις, όπως είναι η καρκινογένεση.

Έπειτα από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, οι πρωτεΐνες ελέγχου και επιδιόρθωσης επεμβαίνουν μέσα σε δευτερόλεπτα και συσσωρεύονται γύρω από τη ΔΚΘ, δημιουργώντας εστίες επιδιόρθωσης. Μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη επιδιόρθωσης είναι η ιστόνη H2AX η οποία κοντά σε ΔΚΘ μετατρέπεται άμεσα στη φωσφορυλιωμένη της μορφή, τη λεγόμενη γH2AX. Οι εστίες επιδιόρθωσης πειραματικά μπορούν να χρωστούν με τη βοήθεια αντισωμάτων τα οποία αφενός προσδένονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες και επιλεγμένες από εμάς πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και αφετέρου φθορίζουν.

Με τη μέθοδο αυτή, τη μέθοδο *in situ* ανοσοφθορισμού, γίνεται δυνατή η παρατήρηση στο μικροσκόπιο των εστιών επιδιόρθωσης, ως εστίες φθορισμού. Η μέθοδος λοιπόν οπτικοποιεί τις ΔΚΘ στη θέση που συμβαίνουν μέσα στο κύτταρο (*in situ*), μέσω της πρόσδεσης των αντισωμάτων που φθορίζουν στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των ΔΚΘ. Η 53BP1 είναι μία ακόμα πρωτεΐνη που μετατοπίζεται γρήγορα στις θέσεις των θραύσεων του DNA μετά την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία και συσσωματώνεται ταχέως με τη γH2AX. Η μέθοδος ανοσοφθορισμού των εστιών της γH2AX είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική αφού έχει επαληθευθεί μία γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των εστιών γH2AX και της δόσης ακτινοβολίας, όταν πρόκειται για ακτινοβολίες χαμηλής LET.

Η έκφραση γH2AX χρησιμοποιείται ευρέως ως ο πρώτος γνωστός δείκτης διάσπασης χρωμοσωματικού DNA και συγκεκριμένα ως ένας ευαίσθητος δείκτης ΔΚΘ επαγόμενων από ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Οι αναλύσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας, βασίζονται σε πείραμα με ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνωμα του πνεύμονα τύπου A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες -Χ, παρουσία ή μη του αναστολέα της DNA-PK, NU7441. Αρχικά, εξετάζεται η συμπεριφορά των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης των ΔΚΘ, γH2AX και 53BP1, στα καρκινικά κύτταρα A549 και μετρώνται για διάφορες δόσεις και για διαφορετικές χρονικές στιγμές η δημιουργία εστιών φθορισμού, παρουσία και μη του αναστολέα της DNA-PK, NU7441. Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση των λογισμικών IMARIS και JQuantPlus, για τη μέτρηση των εστιών γH2AX και 53BP1 με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας καταμέτρησης των εστιών φθορισμού από εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (3D), με το λογισμικό JQuantPlus, το οποίο αναλύει εικόνες 2D. Στη συνέχεια, λόγω της μεγάλης σημασίας των εστιών στην ανίχνευση των ΔΚΘ, μελετάται η ανίχνευση συνεντοπισμού μεταξύ των πρωτεϊνών γH2AX και 53BP1 μέσω της παραμέτρου Pcdc, η οποία συγκρίνει την επιφανειακή φωτεινότητα του σήματος από

την επισημασμένη πρωτεΐνη επιδιόρθωσης των βλαβών βάσεων, η οποία είναι ορισμένη στις εστίες φθορισμού των ΔΚΘ, με το ίδιο μέγεθος ορισμένο στον υπόλοιπο πυρήνα του κυττάρου. Τέλος, διερευνήθηκε η επιδιόρθωση των ΔΚΘ σε συνάρτηση με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της βλάβης, και συγκεκριμένα ως προς την ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη. Αρχικά, μέσω του λογισμικού IMARIS, έγινε ο υπολογισμός της παραμέτρου συνεντοπισμού Pclc του DAPI πάνω στις γH2AX και στη συνέχεια στις 53BP1 εστίες.

Προκειμένου να μειωθεί το σφάλμα για τον υπολογισμό του Pclc, λόγω των εμβαδών της επιφάνειας που χρησιμοποιείται στο Pclc εξ' ορισμού, με χρήση των λογισμικών επεξεργασίας εικόνων JCountPro και JQuantPlus, ακολουθήθηκε μια λεπτομερής διαδικασία αποφυγής και εξαίρεσης των πυρηνίσκων στις εικόνες 2D. Αυτό έγινε, καθώς το DNA στους πυρηνίσκους είναι μονόκλωνο και το DAPI δε μπορεί να βάψει την περιοχή αυτήν και επομένως δεν έχουμε εμφάνιση ΔΚΘ, άρα ούτε και εστιών.

# *Abstract*

Double Strand Breaks (DSBs) are the most dangerous DNA lesions, because they can lead to great loss of genome and thus to mutations, such as carcinogenesis. After exposure to ionizing radiation, repair proteins interfere within seconds and accumulate around the DSBs, creating repair sites. The histone H2AX, which is one of the most significant repair proteins, is phosphorylated rapidly around the DSBs; its phosphorylated form is called “ $\gamma$ H2AX”. The repair sites can be experimentally stained by antibodies that are bound selectively to specific repair proteins and to emit fluorescence. By following this method, known as ‘*in situ* indirect immunofluorescence’, the repair sites are now visualized in the form of ‘foci’. Thus, this method visualizes DSBs *in situ*, through the binding of the specific antibodies against human DNA repair proteins of DSBs. The induction of  $\gamma$ H2AX foci and their progress reflect the induction of DSBs in cells (*in situ*) and the progress of their repair. The p53-binding protein 1, 53BP1, moves rapidly at the site of DNA damage and forms readily visualized ionizing radiation induced foci. The method of immunofluorescence shows that the induction of  $\gamma$ H2AX foci is linearly correlated with radiation dose, in the case of low LET radiation. Overall,  $\gamma$ H2AX foci serve as a sensitive marker of DNA DSB induction.

In this thesis, the analysis is based on human lung cancer cells A549, which were exposed to X-rays. Moreover, chemical inhibition of the DNA repair protein DNA-PK was induced in cell culture, using the inhibitor NU7441. Secondly, there was a comparison between IMARIS and JQuantPlus software applications for counting  $\gamma$ H2AX and 53BP1 foci, in order to evaluate the measurability of foci from images that come from confocal microscopy (3D) and JQuantPlus, which analyzes 2D images. Subsequently, in view of the great importance of foci for the detection of DSBs, we used the parameter Pclc in order to evaluate the colocalization between  $\gamma$ H2AX and 53BP1. Pclc compares the surface 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. Finally, the repair of DSBs was examined in relation to intracellular localization of the lesion, particularly in euchromatin and heterochromatin. By using the IMARIS software, Pclc of DAPI over the  $\gamma$ H2AX foci and Pclc of DAPI over the 53BP1 foci were calculated.

In order to reduce the error of Pclc, a detailed procedure was followed to eliminate the nucleoli in 2D images by using JCountPro and JQuantPlus software products, because of the surface area used in the definition of parameter Pclc. That was considered, as DNA in nucleoli is single-stranded and so DAPI cannot stain that area and therefore does not appear DSBs nor foci.

# Ευχαριστίες

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Αλέξανδρο Γεωργακίλα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας εργασίας, τη συνολική του καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ζαχαρένια Νικητάκη για την διάθεση των πειραματικών της δεδομένων. Η πολύτιμη ηθική και επιστημονική συμπαράστασή της, η παρότρυνση, η υπομονή και οι συνεχείς υποδείξεις σε όλο το διάστημα της συνεργασίας μας, είχαν ως αποτέλεσμα την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Την ευχαριστώ και την εκτιμώ ιδιαίτερα.

Φυσικά δε μπορώ να ξεχάσω τον Γιώργο Φραγκούλη, για τη συνεργασία που είχαμε, για τη βοήθεια που μου έδωσε απλόχερα στην εκμάθηση των λογισμικών και τις απόψεις που ανταλλάξαμε για τις όμορφες εικόνες των κυττάρων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου και όλους τους φίλους και συμφοιτητές μου, που καθίσαμε στα ίδια έδρανα και περάσαμε τόσο όμορφα χρόνια. Η στήριξη και η εμπύχωσή τους σε όλο αυτό το διάστημα υπήρξε ανεκτίμητη.

# Περιεχόμενα

<i>Περίληψη</i> .....	1
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Ευχαριστίες</i> .....	4
<i>Περιεχόμενα</i> .....	5
Σκοπός .....	10
<i>Α' ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i> .....	11
<b>Κεφάλαιο 1: Το Κύτταρο</b> .....	12
1.1 Δομή του κυττάρου .....	12
1.2 Χημική σύσταση του κυττάρου.....	18
1.3 Ο κυτταρικός κύκλος .....	18
1.3.1 Η Μεσόφαση.....	19
1.3.2 Η Μίτωση.....	21
1.3.2.1 Η Πρόφαση .....	22
1.3.2.2 Η Μετάφαση.....	22
1.3.2.3 Η Ανάφαση .....	23
1.3.2.4 Η Τελόφαση .....	23
1.4 Απόπτωση ή Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος.....	24
1.4.1 Ενδογενής μηχανισμός.....	24
1.4.2 Εξωγενής μηχανισμός.....	25
Βιβλιογραφία .....	28
<b>Κεφάλαιο 2: Το DNA</b> .....	30
2.1 Δομή και βασικά συστατικά του DNA.....	30
2.2 Η δομή των νουκλεοτιδίων .....	31
2.3 Χρωμοσώματα και Ρύθμιση των Γονιδίων .....	32
2.3.1 Χρωματίνη: Ευχρωματίνη και Ετεροχρωματίνη .....	33
2.3.1.1 Ευχρωματίνη .....	35
2.3.1.2 Ετεροχρωματίνη.....	36
2.3.2 Αναδιάπλαση της Χρωματίνης.....	38

2.4 Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας: Αντιγραφή, Μεταγραφή και Μετάφραση του DNA.....	39
2.4.1 Η Αντιγραφή.....	40
2.4.2 Η Μεταγραφή.....	41
2.4.3 Η Μετάφραση.....	43
Βιβλιογραφία.....	46
<b>Κεφάλαιο 3: Βλάβες DNA από ακτινοβολία.....</b>	<b>48</b>
3.1 Γενικά για την Ιοντίζουσα Ακτινοβολία.....	48
3.2 Αλληλεπίδραση φωτονίων και ύλης.....	50
3.2.1 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο.....	50
3.2.2 Σκέδαση Compton.....	51
3.2.3 Δίδυμη Γένεση.....	52
3.3 Μέτρηση της ποσότητας της ακτινοβολίας.....	52
3.3.1 Απορροφημένη δόση (D).....	52
3.3.2 Ισοδύναμη Δόση( Hr).....	53
3.3.3 Ενεργός δόση ( $E_{eff}$ ).....	53
3.3.4 Έκθεση.....	54
3.3.5 LET (Linear Energy Transfer) / Γραμμική Εναπόθεση Ενέργειας.....	54
3.4 Ιοντίζουσα Ακτινοβολία και Βιολογικές Επιπτώσεις.....	56
3.4.1 Η LET και η Σχετική Βιολογική Αποτελεσματικότητα (RBE).....	56
3.4.2 Άμεση και Έμμεση δράση.....	57
3.4.2.1 Άμεση Δράση.....	57
3.4.2.2 Έμμεση Δράση.....	57
3.4.3 Επίδραση Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας και Χρόνος.....	58
3.4.4 Η ραδιόλυση του ύδατος.....	58
3.5 Γενικά για τις βλάβες DNA.....	60
3.6 Ομαδοποιημένες βλάβες.....	65
3.6.1 Οι Δίκλωνες Θραύσεις.....	66
3.6.2 Οι τύποι των Δίκλωνων Θραύσεων.....	68
3.7 Μεταλλάξεις του DNA.....	72
3.7.1 Τύποι μεταλλάξεων.....	73
Βιβλιογραφία.....	75



<b>Κεφάλαιο 4: Επιδιόρθωση βλαβών DNA</b> .....	77
4.1 Επιδιόρθωση βλαβών DNA.....	77
4.1.1 Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (Mismatch Repair -MMR) .....	77
4.1.2 Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair-BER) .....	78
4.1.3 Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair-NER) .....	79
4.1.4 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination-HR) .....	81
4.1.5 Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Non-Homologous End-Joining – NHEJ) .....	83
4.2 Επιδιόρθωση βλαβών στην περιοχή της ετεροχρωματίνης.....	84
Βιβλιογραφία .....	87
<b>Κεφάλαιο 5: Μέθοδος Ανίχνευσης Ομαδοποιημένων Βλαβών</b> .....	90
5.1 Μέθοδοι ανίχνευσης ομαδοποιημένων βλαβών .....	91
5.2 Η ιστόνη H2A .....	93
5.3 Η φωσφορυλίωση της ιστόνης.....	94
5.3.1 Η Φύση .....	95
5.3.2 Σκοπός της φωσφορυλίωσης .....	97
5.4 Οι Εφαρμογές της ανίχνευσης εστιών γH2AX .....	97
5.5 Οι Βιοδείκτες.....	98
5.5.1 Η γH2AX ως βιοδείκτης.....	98
5.6 Οι Βασικές Μέθοδοι-Τεχνικές ανίχνευσης γH2AX.....	99
5.6.1 Η Κυτταρομετρία ροής .....	99
5.6.2 Η Μέθοδος ELISA- γH2AX.....	99
5.6.1 Ο <i>In situ</i> ανοσοφθορισμός .....	100
5.7 Η πρωτεΐνη TP53BP1.....	102
5.8 Η παράμετρος εκτίμησης συνεντοπισμού Pclc.....	102
Βιβλιογραφία .....	107
<i>Β' ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i> .....	109
<b>Κεφάλαιο 6</b> .....	110
<b>1<sup>η</sup> μελέτη: Μέτρηση των εστιών των πρωτεϊνών</b> .....	110
<b>γH2AX και 53BP1</b> .....	110
1.1 Σκοπός .....	110
1.2 Μεθοδολογία.....	110

1.3 Υπολογιστικά Αποτελέσματα.....	111
1.4 Παρατηρήσεις- Συμπεράσματα .....	113
Παράρτημα 1 <sup>ης</sup> μελέτης.....	119
<b>2<sup>η</sup> μελέτη: Σύγκριση των λογισμικών IMARIS και JQuantPlus, για τη μέτρηση των εστιών γΗ2ΑΧ και 53BP1.....</b>	<b>120</b>
2.1 Σκοπός .....	120
2.2 Μεθοδολογία της Ανάλυσης .....	120
2.2.1 Η χρήση του λογισμικού ImageJ.....	120
2.2.2 Χρήση του λογισμικού JCountPro.....	125
2.2.3 Η χρήση του λογισμικού JQuantPlus .....	129
2.3 Υπολογιστικά Αποτελέσματα.....	133
2.4 Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα .....	137
Βιβλιογραφία .....	139
<b>Κεφάλαιο 7.....</b>	<b>140</b>
<b>3<sup>η</sup> μελέτη: Συνεντοπισμός επαγόμενων εστιών φθορισμού 53BP1 και γΗ2ΑΧ.....</b>	<b>140</b>
3.1 Σκοπός .....	140
3.2 Μεθοδολογία για υπολογισμό του Pdc.....	140
3.3 Υπολογιστικά Αποτελέσματα.....	143
3.4 Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα .....	145
Βιβλιογραφία .....	148
Παράρτημα 3 <sup>ης</sup> μελέτης.....	149
<b>Κεφάλαιο 8.....</b>	<b>150</b>
<b>4<sup>η</sup> μελέτη : Διάκριση υπερχρωματικών και μη περιοχών στο κύτταρο .....</b>	<b>150</b>
4.1 Σκοπός .....	150
4.2 Μεθοδολογία της Ανάλυσης .....	150
4.3 Ανάλυση με στόχο την αποφυγή των πυρηνίσκων.....	153
4.4 Η ανάλυση με τα λογισμικά .....	154
4.4.1 Η χρήση του λογισμικού JCountPro.....	154
4.4.2 Η χρήση του λογισμικού JQuantPlus .....	157
4.5 Υπολογιστικά Αποτελέσματα.....	158
4.6 Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα .....	164
Βιβλιογραφία .....	169

Παράρτημα 4 <sup>ης</sup> μελέτης.....	170
<b>Συμπεράσματα</b> .....	172
<b>Επίλογος</b> .....	173

# Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βλαβών DNA της σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π, υπεύθυνος του οποίου είναι ο Αναπληρωτής Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας. Σκοπός είναι να μελετηθούν οι Δίκλωνες Θραύσεις του DNA μέσω της μεθόδου του *in situ* έμμεσου ανοσοφθορισμού. Μέσω της μεθόδου **Pdcl**, η οποία προτάθηκε πρώτη φορά στη διδακτορική διατριβή της Ζ.Νικητάκη, προκειμένου να γίνει εφικτή η ανίχνευση των σύνθετων βλαβών DNA, μελετήθηκε ο συνεντοπισμός του σήματος φθορισμού προερχόμενο από τα φθορίζοντα αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των ΔΚΘ στην παρούσα διπλωματική. Ως δείκτες επιλέχθηκαν οι επιδιορθωτικές πρωτεΐνες γH2AX και 53BP1.

Ακόμα, διερευνήθηκε μέσω της μεθόδου Pdcl η επιδιόρθωση των ΔΚΘ σε συνάρτηση με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της βλάβης, και συγκεκριμένα ως προς την ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη, προκειμένου να εξεταστεί αν οι Δίκλωνες Θραύσεις έχουν την ίδια επιδιορθωτική συμπεριφορά όταν βρίσκονται στις περιοχές αυτές αντίστοιχα.

Η ανάγκη για τη μελέτη των Δίκλωνων Θραύσεων έγκειται στο γεγονός ότι είναι δύσκολο να μετρηθούν σωστά, καθώς ακόμα ότι καθορίζουν την τελική βιολογική απόκριση του κυττάρου.

# *Α' ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*

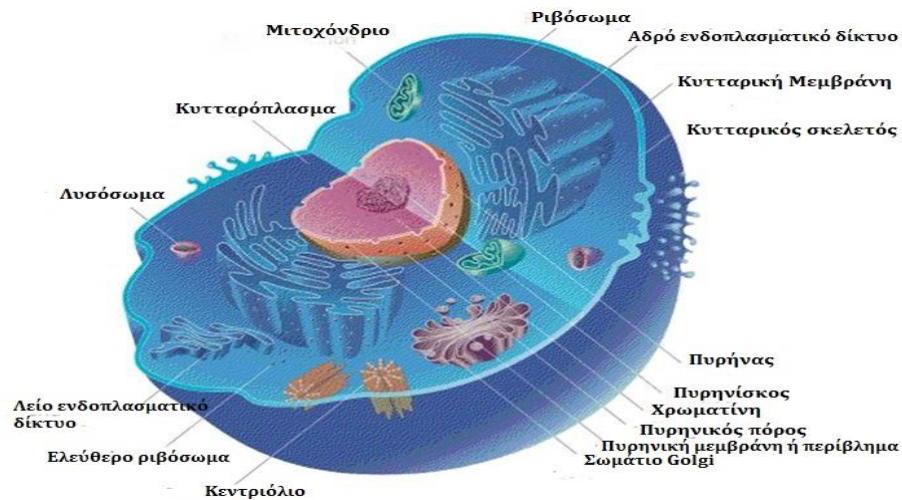
# Κεφάλαιο 1:Το Κύτταρο

Το κύτταρο αποτελεί βασικό στοιχείο της επιστήμης της βιολογίας, αφού αποτελεί την κύρια «δομική» μονάδα των περισσότερων ζωντανών οργανισμών. Για την ακρίβεια το κύτταρο αποτελεί την πιο απλή μορφή οργάνωσης της ύλης που μπορεί να ζει (με εξαίρεση τους ιούς που θεωρούνται από την πλειοψηφία των επιστημόνων ζωντανοί οργανισμοί αλλά δεν αποτελούνται από κύτταρα). Συγκεκριμένα, όμοια κύτταρα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζουν έναν ιστό, ενώ διαφορετικοί ιστοί όταν συνδυαστούν σχηματίζουν ένα όργανο. Ακολούθως, τα διαφορετικά όργανα μαζί αποτελούν ένα σύστημα που επιτελεί μια συγκεκριμένη λειτουργία του οργανισμού, και τέλος όλα τα συστήματα μαζί δημιουργούν έναν οργανισμό. Εκτός από το ότι αποτελούν βασική μονάδα των έμβιων όντων τα κύτταρα ευθύνονται για κάθε λειτουργία των οργανισμών, όπως π.χ. την κίνηση των ματιών καθώς διαβάζονται αυτές οι γραμμές η οποία συμβαίνει λόγω της συστολής των μυϊκών κυττάρων του οφθαλμού. Σε αυτό το κεφάλαιο θα μελετήσουμε τη δομή και την οργάνωση των κυττάρων καθώς και βασικές πλευρές της ζωής και της λειτουργίας τους.

## 1.1 Δομή του κυττάρου

Ανάλογα με το είδος του κυττάρου ποικίλει και η δομή του και τα κυτταρικά του οργανίδια. Οι δύο βασικές κατηγορίες που χωρίζονται τα κύτταρα είναι τα ευκαρυωτικά, όσα δηλαδή εμφανίζουν σχηματισμένο πυρήνα και τα προκαρυωτικά, όσα δεν έχουν πυρήνα. Επίσης, ανάλογα με το αν αποτελούν βασική μονάδα ζωικών ή φυτικών οργανισμών χωρίζονται σε ζωϊκά ή φυτικά αντίστοιχα, και παρουσιάζουν αρκετές δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Οι ανθρώπινοι οργανισμοί αποτελούνται από ζωϊκά ευκαρυωτικά κύτταρα, τα οποία θα περιγράψουμε αναλυτικά.

Ένα τυπικό ζωϊκό ευκαρυωτικό κύτταρο παρουσιάζεται στην **Εικόνα Θ1-1**. Αυτό δεν σημαίνει πως κάθε κύτταρο έχει ακριβώς όλα αυτά τα οργανίδια, αλλά η δομή του ποικίλει ανάλογα με την ξεχωριστή λειτουργία που έχει να επιτελέσει (π.χ. διαφορετικά είναι τα επιθηλιακά κύτταρα από τα οφθαλμικά κ.ο.κ.)

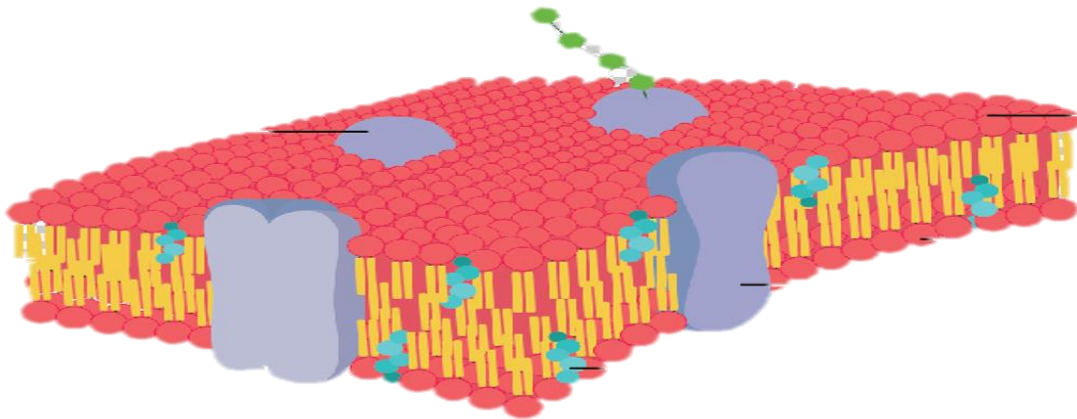


Εικόνα Θ1-1: Η δομή του ζωικού ευκαρυωτικού κυττάρου. Πηγή: Mediran/Wikimedia Commons/CC-BY-SA-3.0

Συγκεκριμένα τα κυριότερα κυτταρικά οργανίδια [1] είναι τα εξής:

#### Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη είναι από τα πιο βασικά στοιχεία της δομής ενός κυττάρου, αφού (μαζί με το κυτταρόπλασμα) υπάρχει σε κάθε κύτταρο και το οριοθετεί με το εξωτερικό του περιβάλλον. Εκτός από το δομικό της ρόλο να διαχωρίζει το κύτταρο από τα εξωκυττάρια υγρά, επιτελεί και λειτουργικό ρόλο, καθώς ρυθμίζει τη μεταφορά πληροφοριών από και προς το κύτταρο, μέσω των πρωτεϊνικών υποδοχέων που βρίσκονται ενσωματωμένοι (διαμεμβρανικοί υποδοχείς) αλλά και τη μεταφορά μορίων ή ιόντων από και προς το κύτταρο (π.χ. αντλία καλίου νατρίου). Αποτελείται κατά κύριο λόγο από πρωτεΐνες (55%) και λιπίδια (42%) αλλά και από ένα μικρό ποσοστό υδατάνθρακες (3%) [2]. Τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης είναι οργανωμένα στη μορφή της διπλοστιβάδας, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Θ1-2**, ούτως ώστε οι υδρόφιλες κεφαλές των λιπιδικών μορίων να προσανατολίζονται προς την υδατική εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια περιοχή και τα υδρόφοβα τμήματα των μορίων να βρίσκονται στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας.



Εικόνα Θ1-2: Η λιπιδική διπλοστιβάδα. Πηγή:Wikimedia Commons

Ανάμεσα στα φωσφολιπίδια υπάρχουν μόρια χοληστερόλης, γλυκολιπιδίων, σακχάρων και πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης είναι ενσωματωμένες και καταλαμβάνουν διαφορετικές θέσεις ανάλογα με τον ρόλο που καλούνται να παίξουν. Μπορεί να είναι διαμεμβρανικές, να διαπερνούν δηλαδή όλο το σώμα της μεμβράνης ή περιφερειακές, να βρίσκονται δηλαδή είτε στο εσωτερικό ή στο εξωτερικό της διπλοστιβάδας.

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν τις οδούς από όπου διακινούνται υδατοδιαλυτές ουσίες και ιόντα και λειτουργούν ως υποδοχείς μικρότερων μορίων που ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν την έκφρασή τους (την έκκριση δηλαδή ουσιών), ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Οι περιφερειακές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εσωτερικό της μεμβράνης έχουν τον ρόλο του ενζύμου και καταλύουν τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ οι περιφερειακές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εξωτερικό της μεμβράνης, είναι συνήθως συνδεδεμένες με υδατάνθρακες και σχηματίζουν γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως υποδοχείς χημικών ερεθισμάτων, συνδέουν γειτονικά κύτταρα μεταξύ τους ή λειτουργούν ως αντιγόνα, τα οποία αναγνωρίζονται από τα αντισώματα του οργανισμού [2].

### Κυτταρόπλασμα

Το κυτταρόπλασμα είναι το παχύρρευστο υγρό το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου ανάμεσα στη μεμβράνη και τον πυρήνα, από την εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέχρι την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του πυρήνα. Μαζί με τον κυτταρικό σκελετό, συγκρατεί όλα τα κυτταρικά οργανίδια.

### Κυτταρικός σκελετός

Ο κυτταρικός σκελετός ανακαλύφθηκε χάρη στην ηλεκτρονική μικροσκοπία και ανέτρεψε την μέχρι τότε αντίληψη πως το κύτταρο ήταν ένας ημίρρευστος σχηματισμός όπου μέσα έπλεαν τα κυτταρικά οργανίδια. Διασχίζει το κυτταρόπλασμα και αποτελείται από ένα πλέγμα ινιδίων το οποίο συγκρατεί τα διάφορα οργανίδια του κυττάρου στις θέσεις του μέσα στο κύτταρο και το ίδιο το κύτταρο.



### Πυρήνας

Ο πυρήνας είναι το κέντρο ελέγχου του κυττάρου το οποίο ελέγχει τις χημικές αντιδράσεις του κυττάρου και την αναπαραγωγή του. Στον πυρήνα βρίσκεται αποθηκευμένο το γενετικό υλικό (DNA) του κυττάρου. Ο πυρήνας περιβάλλεται από την πυρηνική μεμβράνη η οποία έχει πόρους από τους οποίους γίνεται η μεταφορά πληροφορίας (υπό την μορφή μορίων) μεταξύ του πυρήνα και του υπόλοιπου κυττάρου. Εσωτερικό στον πυρήνα υπάρχει το πυρηνόπλασμα, το οποίο διαφέρει σε χημική σύσταση από το κυτταρόπλασμα και αποτελείται κυρίως από RNA και πρωτεΐνες. Στο εσωτερικό του πυρήνα βρίσκεται και ο πυρηνίσκος, στον οποίο συγκεντρώνονται τα διάφορα τμήματα των χρωμοσωμάτων που περιέχουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA ( rRNA).

### Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα σύστημα από σωληνοειδείς και επίπεδες μεμβρανώδεις κύστες. Ανάλογα με το αν υπάρχουν ή όχι ριβοσώματα προσκολλημένα στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του διακρίνεται σε αδρό και λείο αντίστοιχα. Στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο παράγονται οι πρωτεΐνες από τα ριβοσώματα ενώ στο λείο πραγματοποιούνται διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις.

### Σύστημα Golgi

Το σύστημα Golgi αποτελείται από πεπλατυσμένες κοίλες μεμβρανώδεις κύστες. Η βασική του λειτουργία είναι η επεξεργασία και το πακετάρισμα διαφόρων μακρομορίων, κυρίως λιπιδίων και πρωτεϊνών, αλλά και κάποιων υδατανθρακών.

### Ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα είναι μικρά κυτταρικά σωματίδια που αποτελούνται από πρωτεΐνες και RNA. Η κύρια λειτουργία τους είναι η πρωτεϊνική σύνθεση, χρησιμοποιώντας την πληροφορία που βρίσκεται στο αγγελιοφόρο RNA. Βρίσκονται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα ή στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο.

### Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Αποτελούνται από διπλή μεμβράνη εξωτερική και εσωτερική και διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό (DNA). Τα μιτοχόνδρια μεταβολίζουν τα βιολογικά μακρομόρια που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί μέσω της τροφής, διασπώντας τους υδατάνθρακες και τα λίπη ώστε να συνθέσουν μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ποικίλει ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κάθε κυττάρου.

### Λυσοσώματα

Τα λυσοσώματα είναι μεμβρανώδεις σάκοι που περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα. Αποτελούν το πεπτικό σύστημα του κυττάρου διασπώντας τα υπερεπαρκή οργανίδια, τμήματα τροφής, ενκυτωμένους ιούς και βακτήρια. Η βιολογική μεμβράνη που περικλείει τα λυσοσώματα εμποδίζει την έξοδο των πεπτικών ενζύμων έξω από αυτά και την καταστροφή του κυττάρου.

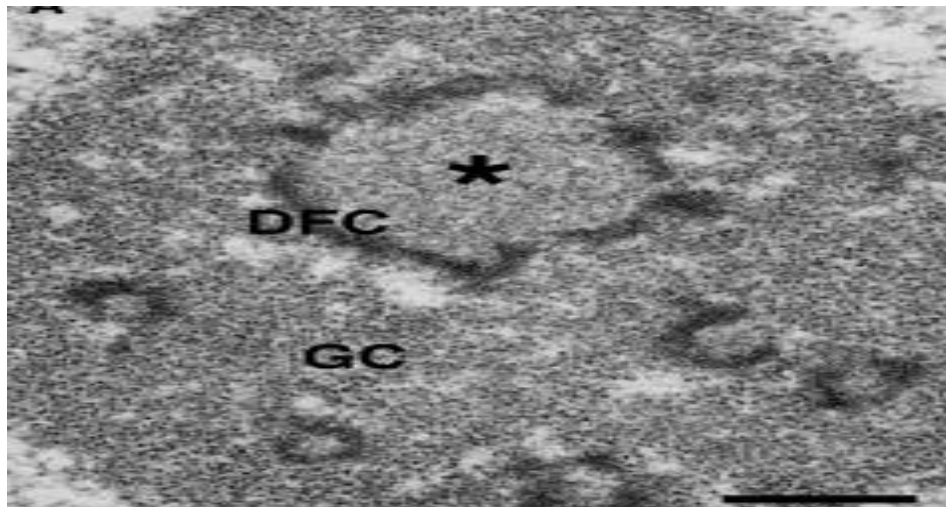
### Κεντροσωμάτιο

Το κεντροσωμάτιο αποτελείται από τα κεντρίδια, το Κέντρο Οργάνωσης Μικροσωληνίσκων (ΚΟΜ ή ΜΤΟC-microtubuleorganizingcentre ) και τον περικεντριδιακό χώρο. Βρίσκεται στο κέντρο του κυττάρου, κοντά στον πυρήνα και οργανώνει τους μικροσωληνίσκους, για να σχηματίσουν την μιτωτική άτρακτο.

### Πυρηνίσκος

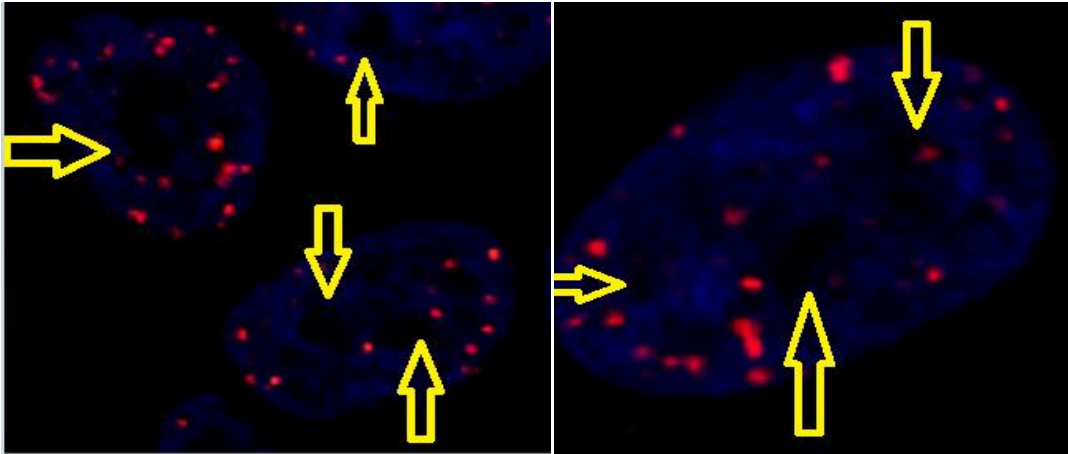
Κατά την θεωρία, ο πυρηνίσκος είναι ένα εργοστάσιο παραγωγής ριβοσωμάτων, το οποίο έχει σχεδιαστεί για να ικανοποιεί την ανάγκη παραγωγής μεγάλης κλίμακας rRNAs και συναρμολόγηση των ριβοσωμικών υπομονάδων. [24] Οι πυρηνίσκοι έχουν επίσης έναν πιο γενικό ρόλο στην τροποποίηση του RNA και αρκετοί τύποι μορίων RNA κινούνται από και προς τον πυρηνίσκο σε συγκεκριμένα στάδια της επεξεργασίας τους. Κάθε πυρήνας μπορεί να έχει έναν ή και περισσότερους πυρηνίσκους.

Από μορφολογική άποψη, **Εικόνα Θ1-3**, ο πυρηνίσκος διακρίνεται σε τρεις περιοχές: το ινώδες κέντρο (fibrillarcenter-FC), το πυκνό ινώδες συστατικό (densefibrillarcomponent-DFC) και το κοκκιώδες συστατικό( granularcomponent-GC). Τα ινώδη κέντρα είναι καθαρές περιοχές, οι οποίες είναι εξ' ολοκλήρου ή μερικώς περιβαλλόμενες από έντονα αντίθετες περιοχές, τα πυκνά ινώδη συστατικά. Και οι δύο αυτές περιοχές, είναι ενσωματωμένες στο κοκκιώδες συστατικό, το οποίο αποτελείται από κόκκους διαμέτρου 15-20 nm. Η συμπυκνωμένη χρωματίνη που περιβάλλει ένα μέρος του πυρήνα είναι ορατή χρησιμοποιώντας πρότυπες μεθόδους χρώσης και επίσης ως ένα δίκτυο εντός του πυρήνα. Οι πυρηνίσκοι διαφορετικών τύπων κυττάρων, εμφανίζουν μεταβλητό αριθμό ιωδών κέντρων και μεγεθών, με αντίστροφη αναλογία μεταξύ μεγέθους και αριθμού. Γενικά, τα κύτταρα με υψηλό ρυθμό βιογένεσης ριβοσώματος διαθέτουν πολυάριθμα μικρά ινώδη κέντρα. Αντίθετα, τα κύτταρα με πολύ μειωμένες μεταβολικές και μεταγραφικές δραστηριότητες παρουσιάζουν μικρούς πυρήνες με ένα ινώδες κέντρο μεγάλου μεγέθους.[25]



Εικόνα Θ1-3: Ο πυρηνίσκος των κυττάρων θηλαστικών όπως φαίνεται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Φαίνονται τα τρία κύρια συστατικά, το ινώδες κέντρο (fibrillar center-FC), το πυκνό ινώδες συστατικό (dense fibrillar component-DFC) και το κοκκιώδες συστατικό (granular component-GC). Πηγή: *Nucleolus: the fascinating nuclear body*[3]

Αυτές οι διαφορετικές περιοχές θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν τις θέσεις όπου επιτελούνται τα διαδοχικά στάδια της μεταγραφής rRNA, της επεξεργασίας rRNA και της συναρμολόγησης των ριβοσωμάτων αντίστοιχα. Η τροποποίηση άλλων μικρών μορίων RNA, όπως αυτών του σωματίου αναγνώρισης σήματος, λαμβάνει χώρα σε άλλες περιοχές του πυρηνίσκου. Το μέγεθος του πυρηνίσκου εξαρτάται από τη μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου, δηλαδή μεγάλοι πυρηνίσκοι συναντώνται σε κύτταρα με έντονη πρωτεϊνοσυνθετική ενεργότητα. Αυτή η διακύμανση μεγέθους οφείλεται κυρίως σε διαφορές στο μέγεθος του κοκκιώδους συστατικού του πυρηνίσκου, που αντανακλούν τα διαφορετικά επίπεδα συναρμολόγησης των ριβοσωμάτων. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Run-DeJiangetal. [26], μέσω της μορφομετρικής ανάλυσης στην υπερδομή των κυττάρων τύπου A549, που εξετάζεται στην παρούσα διπλωματική, ο πυρήνας αποτελείται από περίπου 8% πυρηνίσκους, 72% ευχρωματίνη και 20% ετεροχρωματίνη. Από τις εικόνες του μικροσκόπιου, ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποιες, στις οποίες φαίνεται έντονα το «πρόβλημα» του πυρηνίσκου, στην **Εικόνα Θ1-4**.



Εικόνα Θ1-4: Εικόνες από το μικροσκόπιο που διακρίνονται εμφανώς με τα κίτρινα βέλη οι πυρηνίσκοι.

## 1.2 Χημική σύσταση του κυττάρου

Παρά τον καίριο ρόλο που παίζουν στην ύπαρξη της ζωής, τα κύτταρα αποτελούνται από περιορισμένο αριθμό χημικών στοιχείων. Συγκεκριμένα ο Άνθρακας (C), το Υδρογόνο (H), το Οξυγόνο (O), το Άζωτο (N), ο Φώσφορος(P) και το Θείο (S) αποτελούν το 99% περίπου του βάρους του. Το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου αποτελεί το νερό (70%) και οι περισσότερες ενδοκυτταρικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε υδατικό περιβάλλον, ενώ το υπόλοιπο 15-25% που απομένει αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες (10-20%), λιπίδια (2-3%), υδατάνθρακες και ανόργανες ενώσεις (οξέα, βάσεις, άλατα) τα οποία αν και σε πολύ μικρή συγκέντρωση παίζουν καθοριστικό ρόλο για τη ρύθμιση του pH του κυττάρου [1].

## 1.3 Ο κυτταρικός κύκλος

Με τον όρο κυτταρικό κύκλο περιγράφεται η διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο διέρχεται μέσω διαφόρων λειτουργικών φάσεων έως ότου διαιρεθεί σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Είναι πολύ σημαντικό για την ομαλή λειτουργία των οργανισμών να εξασφαλίζεται η σωστή έκβαση του κυτταρικού κύκλου και γι αυτόν τον λόγο αναπτύχθηκε ένα περίπλοκο σύστημα ρυθμιστικών πρωτεϊνών γνωστό ως σύστημα ελέγχου κυτταρικού κύκλου. Αυτό το σύστημα διαθέτει βιολογικούς “διακόπτες”, οι οποίοι ελέγχουν τα κύρια συμβάντα του κύκλου, όπως η αντιγραφή του DNA και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων. Η φάση κατά την οποία το κύτταρο εκτελεί τις

χαρακτηριστικές λειτουργίες του και που συνήθως έχει τη μεγαλύτερη διάρκεια ονομάζεται μεσόφαση. Έπειτα από την μεσόφαση ακολουθεί η μίτωση κατά την οποία το κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα.



Εικόνα Θ1-5:Οκυτταρικός κύκλος. Πηγή: University of Arizona, The Biology Project

### 1.3.1 Η Μεσόφαση

Η μεσόφαση είναι η φάση κατά την οποία το κύτταρο εκτελεί εξειδικευμένες λειτουργίες ανάλογα με τον τύπο του ή την αναπτυξιακή του κατάσταση. Διαιρείται σε τρία επιμέρους στάδια, το στάδιο G<sub>1</sub> (Gap 1) το οποίο ακολουθεί ακριβώς μετά τη μίτωση, το στάδιο S (Synthesis) κατά το οποίο λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός του DNA και το στάδιο G<sub>2</sub> (Gap 2) το οποίο έπεται του διπλασιασμού του DNA και προηγείται της μίτωσης [16].

- **Η φάση G<sub>1</sub>**

Κατά τη διάρκεια της φάσης G<sub>1</sub>, το κύτταρο μεγαλώνει σε μέγεθος και συνθέτει mRNA και πρωτεΐνες (ιστόνες) οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του DNA [3]. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του κυττάρου και συντεθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες, το κύτταρο εισέρχεται στη φάση S. Η διάρκεια της κάθε φάσης εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και μπορεί να διαφέρει σημαντικά σε κάθε οργανισμό. Επιπλέον εξαρτάται και από διάφορους εξωγενείς παράγοντες όπως τα θρεπτικά συστατικά που έχει στη διάθεσή του το κύτταρο, η θερμοκρασία αλλά και η επάρκεια χώρου για ανάπτυξη [3][4].

- **Η φάση S**

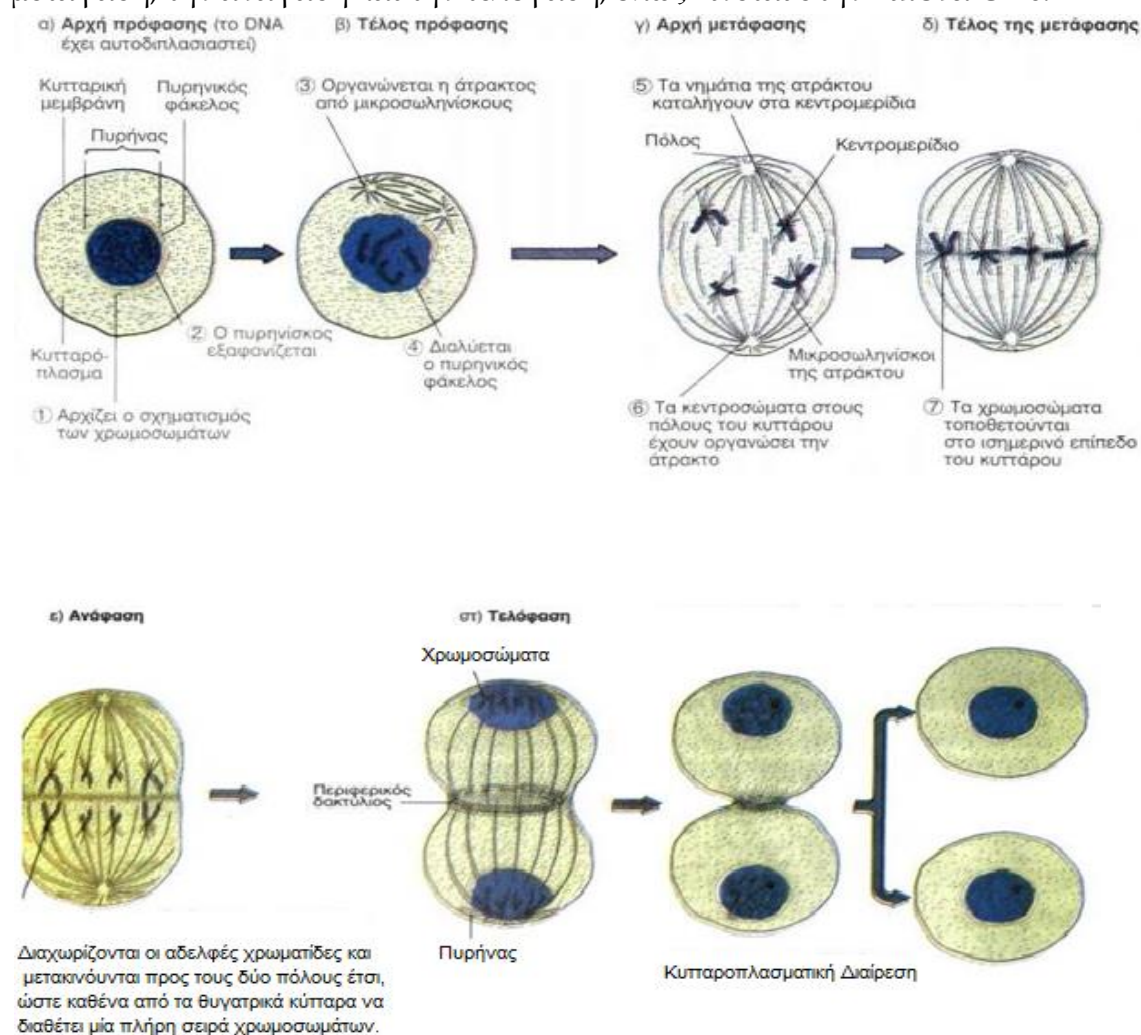
Η μετάβαση από τη φάση G<sub>1</sub> στη φάση S είναι ένα πολύ σημαντικό σημείο ελέγχου για τον κυτταρικό κύκλο. Το κεντροσωμάτιο και όλο το γενετικό υλικό του κυττάρου πρέπει να διπλασιαστούν ώστε να δημιουργηθούν δύο όμοια θυγατρικά κύτταρα [5]. Ο διπλασιασμός του DNA συμβαίνει κατά τη διάρκεια της φάσης S (από τη λέξη synthesis – σύνθεση). Ανάλογα με το επίπεδο των θρεπτικών συστατικών, της ενέργειας και των εξωτερικών παραγόντων, το κύτταρο πρέπει να αποφασίσει αν θα εισέλθει στον κυτταρικό κύκλο ή θα προχωρήσει σε μια «μη διαιρετική» κατάσταση που ονομάζεται φάση G<sub>0</sub>. Αυτή η μετάβαση, όπως και όλες οι βασικές μεταβατικές καταστάσεις στον κυτταρικό κύκλο, σηματοδοτούνται από τις κυκλίνες και της κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin dependent kinase- CDKs), οι οποίες αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες του κυττάρου (regulatory proteins) [4]. Το πιο σημαντικό γεγονός της φάσης S είναι ο διπλασιασμός του DNA, ώστε να δημιουργηθούν δύο πανομοιότυπα αντίτυπα. Η ελικάση είναι ένα πρωτεϊνικής φύσεως ένζυμο, που ξετυλίγει τη διπλή έλικα του DNA σε εσωτερικά σημεία του χρωμοσώματος, υδρολύοντας ATP για να παραγάγει την απαραίτητη ενέργεια για το διαχωρισμό των δύο κλώνων [6]. Έπειτα η DNA πολυμεράση προσδένεται στην ανοιχτή αλυσίδα του DNA και δημιουργεί την συμπληρωματική της αλυσίδα, βάσει του κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η σύνθεση του DNA είναι μια ιδιαίτερος ταχεία διαδικασία (αντιγράφονται 2000 νουκλεοτίδια/s), κατά την οποία πρέπει να συμβαίνουν λιγότερα από δύο σφάλματα ανά 10<sup>10</sup> νουκλεοτίδια που προστίθενται [6]. Οι βλάβες που προκύπτουν στο DNA εντοπίζονται και διορθώνονται κατά τη φάση S. Όταν εντοπίζεται τμήμα του DNA το οποίο έχει υποστεί βλάβη ενεργοποιείται η κινάση ATR, η οποία σταματά τη διαδικασία της αντιγραφής, εμποδίζει τη μίτωση και κρατά την έλικα ανοιχτή έως ότου να έρθουντα διορθωτικά ένζυμα και να διορθώσουν τη βλάβη [7].

- **Η φάση G<sub>2</sub>**

Η φάση G<sub>2</sub> είναι μια περίοδος ραγδαίας κυτταρικής ανάπτυξης και πρωτεϊνοσύνθεσης κατά τη διάρκεια της οποίας το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μίτωση. Δεν είναι απαραίτητο πως όλα τα κύτταρα θα περάσουν από αυτό το στάδιο, καθώς π.χ. τα κύτταρα του νεαρού εμβρύου του οργανισμού *Xenopus* [9] αλλά και κάποια καρκινικά κύτταρα [10], προχωρούν απευθείας από την αντιγραφή του DNA στη μίτωση. Το τέλος της φάσης G<sub>2</sub> σηματοδοτείται από τη συγκέντρωση ενός συμπλόκου κυκλινών, η δράση του οποίου ρυθμίζεται πολύ αυστηρά κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης.

### 1.3.2 Η Μίτωση

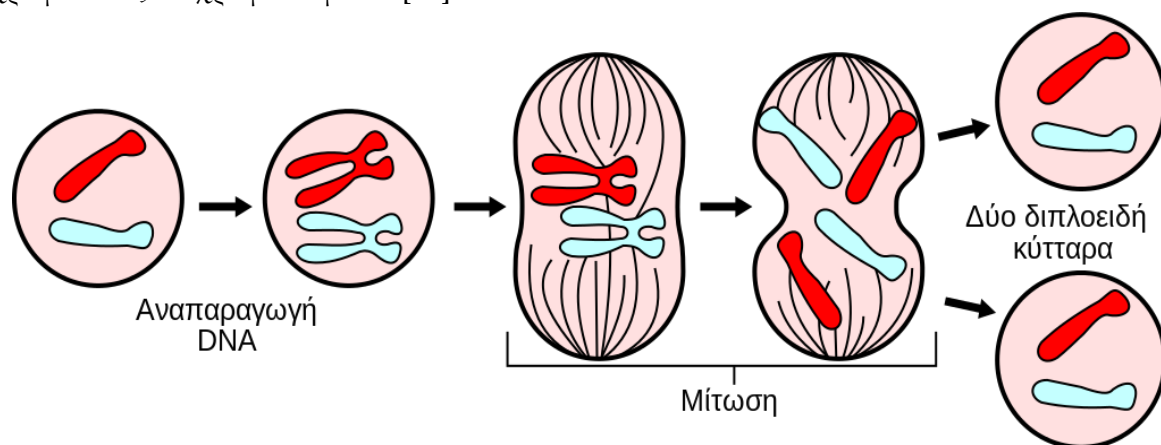
Η μίτωση είναι η φάση κατά την οποία διχοτομούνται τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Μετά την αντιγραφή του DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S της μεσόφασης, το γενετικό υλικό βρίσκεται σε δύο αντίγραφα τα οποία ονομάζονται αδελφές χρωματίδες και βρίσκονται ενωμένες στο κεντρομερίδιο τους. Όταν ολοκληρωθεί η μίτωση, προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα όμοια με το μητρικό, το οποίο έχει διαχωριστεί με μία διαδικασία που ονομάζεται κυτοκίνηση [15]. Η μίτωση είναι μία σύνθετη και αυστηρά καθορισμένη διαδικασία που χωρίζεται σε επιμέρους φάσεις, την πρόφαση, την μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση, όπως δίνεται στην **Εικόνα Θ1-6**.



Εικόνα Θ1-6: Συνοπτική παρουσίαση των φάσεων της μίτωσης σε ζωικό κύτταρο. Πηγή: Σχολικό Βιβλίο Βιολογίας Β' ΓΕΛ.

### 1.3.2.1 Η Πρόφαση

Κατά τη διάρκεια της πρόφασης, η οποία λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τη φάση G<sub>2</sub> της μεσόφασης, το κύτταρο προετοιμάζεται για τη διχοτόμησή του, αρχίζοντας με την πυκνώση της δομής των χρωματίδων σε χρωμοσώματα (η οποία διευκολύνει τον μετέπειτα διαχωρισμό τους) και το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Η μιτωτική ατράκτος αποτελείται από μικροσωληνίσκους και αποτελεί κομμάτι του κυτταρικού σκελετού. Ο συντονισμός των μικροσωληνίσκων για τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου διευθετείται από το κεντροσωμάτιο του κυττάρου και ο ρόλος της είναι να οργανώσει τα χρωμοσώματα και να τα μετακινήσει (με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών) προς τις άκρες του κυττάρου που πρόκειται να διπλασιαστεί. Ο πυρηνίσκος εξαφανίζεται σε αυτή τη φάση [11], γεγονός που αποτελεί μία ένδειξη πως ο πυρήνας πρόκειται να αποσυντεθεί. Κατά τη διάρκεια της όψιμης πρόφασης (ή προμετάφασης) τα χρωμοσώματα βρίσκονται στην πιο συμπυκνωμένη μορφή τους και απελευθερώνονται έπειτα από τη διάρρηξη του πυρηνικού φακέλου. Οι κινετοχωρικοί μικροσωληνίσκοι προσαρτούν τα χρωμοσώματα μέσω του κινετοχώρου, ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος που βρίσκεται στο κεντροσωμάτιο που ενώνει τις χρωματίδες σε χρωμοσώματα [12].



Εικόνα Θ1-7: Η διαδικασία της μίτωσης. Πηγή: Wikimedia commons

### 1.3.2.2 Η Μετάφαση

Κατά την έναρξη της μετάφασης, η ατράκτος έχει προσαρτήσει όλα τα χρωμοσώματα και τα έχει διευθετήσει στο κέντρο του κυττάρου, στη μεταφασική πλάκα. Οι δύο κινετοχώροι κάθε χρωμοσώματος (ένας σε κάθε χρωματίδα) βρίσκονται προσαρτημένοι στους μικροσωληνίσκους και προσανατολισμένοι στους δύο αντίθετους πόλους του κυττάρου. Τα δύο κεντροσωμάτια, που έχουν προκύψει από το διπλασιασμό του κεντροσωμάτιου του κυττάρου στις φάσεις G<sub>1</sub> και S, έχουν το ρόλο να “τραβήξουν” τις χρωματίδες προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου, έτσι ώστε το γενετικό υλικό να



χωριστεί σωστά στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Σε αυτό το σημείο γίνεται αυστηρός έλεγχος από το κύτταρο, και αν μία χρωματίδα δεν είναι προσαρτημένη σωστά στους μικροσωληνίσκους, η διαδικασία σταματά μέχρι να διορθωθεί το πρόβλημα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μιτωτικό σημείο ελέγχου [13].

### 1.3.2.3 Η Ανάφαση

Στην ανάφαση A, και αφού έχει ολοκληρωθεί το μιτωτικό σημείο ελέγχου, διαχωρίζονται οι αδερφές χρωματίδες δημιουργώντας δύο πανομοιότυπα θυγατρικά χρωμοσώματα και οι κινετοχωρικοί μικροσωληνίσκοι τις “τραβούν” προς τις δύο άκρες του κυττάρου. Στην ανάφαση B, οι μικροσωληνίσκοι οι οποίοι δεν είχαν προσαρτηθεί στις χρωματίδες επιμηκύνονται, επιμηκύνοντας τελικά και το ίδιο το κύτταρο [14].

### 1.3.2.4 Η Τελόφαση

Κατά την τελόφαση, συνεχίζεται η επιμήκυνση του κυττάρου μέσω των μικροσωληνίσκων, αλλά το κύτταρο αρχίζει να επανακτά την αρχική του δομή. Ο πυρηνικός φάκελος επανασχηματίζεται και ο πυρηνίσκος επανεμφανίζεται. Διαλύεται η μιτωτική άτρακτος και σταδιακά εμφανίζονται δύο πυρήνες, προσανατολισμένοι στους δύο πόλους του κυττάρου που είναι έτοιμο να διασπαστεί. Οι χρωματίδες αποσυμπυκνώνονται.

### Κυτοκίνηση

Στα τελευταία στάδια της μίτωσης (συνήθως στην τελόφαση ή την όψιμη ανάφαση) εκκινά η κυτοκίνηση. Η πρώτη ένδειξη για την επακόλουθη κυτοκίνηση εμφανίζεται ως μια αδρή εγκόλπωση της κυτταρικής επιφάνειας σε μια στενή ζώνη γύρω από το μέσο του προς διαίρεση κυττάρου[16]. Στη συνέχεια αυτή η εγκόλπωση βαθιάνει, σχηματίζοντας ένα δακτύλιο ο οποίος ολοένα και συσφίγγεται, έως ότου ενωθούν τα αντίθετα άκρα του και προκληθεί η αποκόλληση των δύο θυγατρικών κυττάρων. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία παίζουν κάποιοι πρωτεϊνικοί σχηματισμοί που ονομάζονται ινίδια ακτίνης και ινίδια μυοσίνης II [15]. Τελικά, το κυτταρόπλασμα διαχωρίζεται και το κάθε θυγατρικό κύτταρο που προκύπτει έχει ένα ακριβές αντίγραφο του γονιδιώματος του αρχικού κυττάρου.

## 1.4 Απόπτωση ή Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια φυσιολογική διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και διαφέρει από τη νέκρωση, η οποία συμβαίνει όταν το κύτταρο καταστρέφεται ξαφνικά (π.χ. λόγω χημικής τοξικότητας). Η απόπτωση μπορεί να προκληθεί από πολλούς εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες, όπως οι ιοί, η ακτινοβολία, κάποια ανεπανόρθωτη βλάβη στο DNA ή η γήρανση του κυττάρου. Η απόπτωση είναι μια γενετικά καθορισμένη και ενεργητική διαδικασία (απαιτείται κατανάλωση ενέργειας με την μορφή ATP), η οποία είναι πολύ σημαντική για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού και τη ρύθμιση του αριθμού των κυττάρων. Ανεπαρκής απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη αύξηση των κυττάρων και τον σχηματισμό όγκων ή ακόμα και καρκίνου, ενώ υπερβολική απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε ατροφία.

Για να εκκινήσει η μη αναστρέψιμη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, πρέπει να ληφθούν από το κύτταρο ειδικά αποπτωτικά σήματα. Οι δύο μηχανισμοί που ενεργοποιούν την απόπτωση είναι ο ενδογενής μηχανισμός (μιτοχονδριακή ρύθμιση) και ο εξωγενής μηχανισμός (άμεση σηματοδοτική οδός) [1].

### 1.4.1 Ενδογενής μηχανισμός

Τα μιτοχόνδρια, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.1, είναι απαραίτητα για τη ζωή του κυττάρου, καθώς παράγουν την ενέργεια που χρειάζεται. Ένα ειδικό αποπτωτικό σήμα για την έναρξη του κυτταρικού θανάτου είναι η έκκριση αποπτωτικών πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ως στόχο τα μιτοχόνδρια. Μπορεί να προκαλέσουν διόγκωση του μιτοχονδρίου μέσω των μεμβρανικών πόρων ή να αυξήσουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο να απελευθερωθούν αποπτωτικοί παράγοντες [18]. Έπειτα από την σηματοδότηση της εκκίνησης του κυτταρικού θανάτου, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα ειδικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, οι SMACs (Second Mitochondrial Activators of Caspases), οι οποίες προσδένονται σε πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση (IAPs – Inhibiting Apoptosis Proteins). Οι IAPs αναστέλλουν τη δράση μιας άλλης οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση του κυττάρου και παίζουν κύριο ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης [19]. Οι κασπάσες συνιστούν μια εξελικτικά διατηρημένη πρωτεϊνική οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεασών οι οποίες διαθέτουν κυστίνη στο ενεργό τους κέντρο και ανιχνεύονται σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων με τη μορφή πρόδρομων ανενεργών προ-ενζύμων. Ένα από τα πιο ενδεικτικά στοιχεία που σηματοδοτούν την έναρξη της απόπτωσης είναι η μετατροπή του προ-ενζύμου σε κασπάση, μέσω πρωτεόλυσης. Η πρώτη ενεργοποιημένη κασπάση ονομάζεται εναρκτήριοις κασπάση

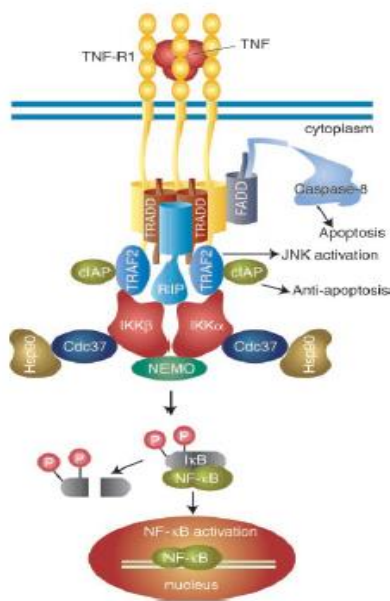
και ενεργοποιεί δια μέσω διαδοχικών πρωτεολύσεων την ενεργοποίηση και άλλων κασπασών οι οποίες ονομάζονται κασπάσες τελεστές [17]. Έπειτα, το κυτόχρωμα-C μετακινείται στο κυτοσόλιο από το μιτοχονδριακό μεσομεμβρανικό χώρο μέσω του διαύλου MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel) [20] και συνδέεται εκλεκτικά με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες στόχους, γεγονός ιδιαίτερα καθοριστικό για τη διάδοση του αποπτωτικού σήματος [17]. Το κυτόχρωμα-C ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1, ολιγομερίζοντάς την. Η σύνδεση (παρουσία ATP) του κυτοχρώματος-C με την Araf-1 προκαλεί αλλαγές στην χωροταξική διαμόρφωση της δεύτερης, αποκαλύπτοντας θέσεις σύνδεσης με την πρόδρομη μορφή της κασπάσης 9 (προκασπάση 9), συγκροτώντας το αποπτώσωμα. Στο αποπτώσωμα η προκασπάση μεταπίπτει στην ενεργή μορφή της, την κασπάση-9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη καθοριστή κασπάση-3.

#### 1.4.2 Εξωγενής μηχανισμός

Τα δύο μονοπάτια του άμεσου σηματοδοτικού μηχανισμού τα οποία εκκινούν την απόπτωση αφορούν σε αλληλεπιδράσεις διαμεμβρανικών υποδοχέων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είτε περιλαμβάνουν παράγοντες κυτταρικού θανάτου που ανήκουν στην οικογένεια του TNF (Tumor Necrosis Factor) ή αφορούν στο μοντέλο σύνδεσης Fas- συνδέτη Fas [19] [21].

- **Μονοπάτι του TNF**

Ο TNF είναι μία κυτοκίνη που παράγεται από τα μακροφάγα και στα περισσότερα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος υπάρχουν δύο υποδοχείς της, ο TNFR1 και ο TNFR2. Μετά τη σύνδεση του TNF στον TNFR1, εκκινά ένα ενδοκυτταρικό μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών, μέσω των μεμβρανικών πρωτεϊνών περιοχής θανάτου, οι οποίες σχετίζονται με τον TNFR1 και καταλήγει στην ενεργοποίηση δύο σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων τον πυρηνικό παράγοντα B (NF-κB) και τον c-Jun. Αυτοί οι παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την επαγωγική έκφραση των γονιδίων που ευθύνονται για τον κυτταρικό -κθάνατο και άρα για την έκκριση των πρωτεϊνών που καταστρέφουν το κύτταρο [22].



Εικόνα Θ1-8: Το μονοπάτι του TNF. Πηγή: Chen G, Goeddel DV (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science*

- **Μονοπάτι του Fas - συνδέτη Fas**

Το μονοπάτι του Fas -του συνδέτη Fas- αφορά τη σύνδεση της πρωτεΐνης Fas (Firstapoptosissignal) με το διαμεμβρανικό της υποδοχέα. Το σύμπλοκο που δημιουργείται ονομάζεται DISC (Death Inducing Signaling Complex) και περιέχει τις πρωτεΐνες που εκκινούν τον κυτταρικό θάνατο, την Fas-associated death domain protein ή FADD, την κασπάση 8 και την κασπάση 10 [22].

### Ολοκλήρωση της Απόπτωσης

Μόλις το κύτταρο λάβει το ερέθισμα του θανάτου από οποιοδήποτε από τα προαναφερθέντα μονοπάτια, αρχίζει να αποδομεί με συγκροτημένο τρόπο τα οργανίδια του. Ο κυτταρικός σκελετός αποδομείται από τις κασπάσες κι έτσι το κύτταρο συρρικνώνεται και γίνεται σφαιρικό. Σε αυτήν τη φάση, το κυτταρόπλασμα φαίνεται πυκνό και τα οργανίδια συμπυκνωμένα. Η χρωματίνη, μέσω της διαδικασίας της πύκνωσης, συμπυκνώνεται σε συμπαγή κομμάτια στον πυρηνικό υμένα<sup>1</sup>. Ο πυρηνικός φάκελος αρχίζει να εμφανίζει ασυνέχειες και μέσω της διαδικασίας της καρύωσης, το

<sup>1</sup>Η πυρηνική μεμβράνη περιβάλλεται από δύο δίκτυα πρωτεϊνικών ινιδίων, τα οποία βοηθούν στην στήριξη του πυρήνα. Το εσωτερικό δίκτυο ινιδίων ονομάζεται πυρηνικός υμένας και αποτελείται από μια πρωτεΐνη, τη λαμίνη.

DNA αποδομείται σε μικρά κομμάτια. Η κυτταρική μεμβράνη αρχίζει να παρουσιάζει πολλά εξογκώματα, τα οποία τελικά σχηματίζουν τα κυστίδια στα οποία διασπάται το κύτταρο, που ονομάζονται αποπτωτικά σώματα. Τα αποπτωτικά σώματα φαγοκυτταρώνονται από ειδικά φαγοκύτταρα, κυρίως μακροφάγα, τα οποία λαμβάνουν ειδικά σήματα που εκκρίνονται από τα κυστίδια [23].

## Βιβλιογραφία

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition., New York: Garland Science; 2002.
2. Cooper GM., *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition., Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
3. Lodish, Harvey, et al. *Molecular Cell Biology*. 6th. New York City: W.H. Freeman and Company, 2008. Print.
4. Morgan, David. *The Cell Cycle: Principals of Control*. London: New Science Press LTD, 2007. Print
5. Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Hopkin, Karen; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter (2014). *Essential Cell Biology (Fourth ed.)*. New York, New York, USA: Garland Science.
6. Bell, S.P. and Dutta, A.: DNA replication in eukaryotic cells. *Annu.Rev.Biochem.* 2002,71:333–374.
7. Branzei, D and Foiani, M.: The DNA damage response during DNA replication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, 17:568–575.
8. Moseley, J. B.; Mayeux, A.; Paoletti, A.; Nurse, P. (2009). "A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast".*Nature*.459 (7248): 857–860.
9. Sha, W.; Moore, J.; Chen, K.; Lassaletta, A. D.; Yi, C. S.;Tyson, J. J.; Sible, J. C. (2002)."Hysteresis drives cell-cycle transitions in *Xenopus laevis* egg extracts".*Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100 (3): 975–980.
10. Liskay, R. M. (1977)."Absence of a measurable G2 phase in two Chinese hamster cell lines".*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.74 (4): 1622–1625.
11. Olson MO (2011).*The Nucleolus*. Volume 15 of *Protein Reviews*. Berlin: Springer Science & Business Media.
12. Winey M, Mamay CL, O'Toole ET, Mastronarde DN, Giddings TH, McDonald KL, McIntosh JR (June 1995). "Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle". *The Journal of Cell Biology*. 129 (6): 1601–15.
13. Chan GK, Yen TJ (2003). "The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit". *Progress in Cell Cycle Research*. 5: 431–9.
14. Miller KR (2000). "Anaphase".*Biology*(5 ed.).Pearson Prentice Hall.
15. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). *The cell cycle*. In *Campbell biology*(10th ed., pp. 232-250). San Francisco, CA: Pearson.
16. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2003), *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Proliferation*, 36: 131-149.
17. Α.Χ. Μαργαρίτης, Β.Κ. Γαλανόπουλος, Κ.Ε. Κεραμάρης, Ε.Σ. Μαρίνος, Ι.Σ. Παπασιδέρη, Δ.Ι. Στραβοπόδης, Ι.Π. Τρουγκάκος, *Βιολογία Κυττάρου, Τέταρτη Έκδοση, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας*

18. Cotran, Ramzi, S.; Kumar, Collins (1998). Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company.
19. Susan Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, Toxicologic Pathology, Vol 35, Issue 4, pp. 495 – 516
20. Laurent M. Dejean; Sonia Martinez-Caballero; Kathleen W. Kinnally (2006). "Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis?". Cell Death and Differentiation. 13 (8): 1387–5.
21. Wajant H (2002). «The Fas signaling pathway: more than a paradigm». Science 296 (5573): 1635–6
22. Chen G, Goeddel DV (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". Science. 296(5573): 1634–5
23. Santos A. Susin; Daugas, E; Ravagnan, L; Samejima, K; Zamzami, N; Loeffler, M; Costantini, P; Ferri, KF et al.. (2000). "Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis". Journal of Experimental Medicine 192 (4): 571–80.
24. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
25. Valentina Sirri, Silvio Urcuqui-Inchima, Pascal Roussel, and Danièle Hernandez-Verdun "Nucleolus: the fascinating nuclear body", 2008
26. Run-De Jiang, Hong Shen, Ying-Jie Piao, "The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells", 2010.

## Κεφάλαιο 2: Το DNA

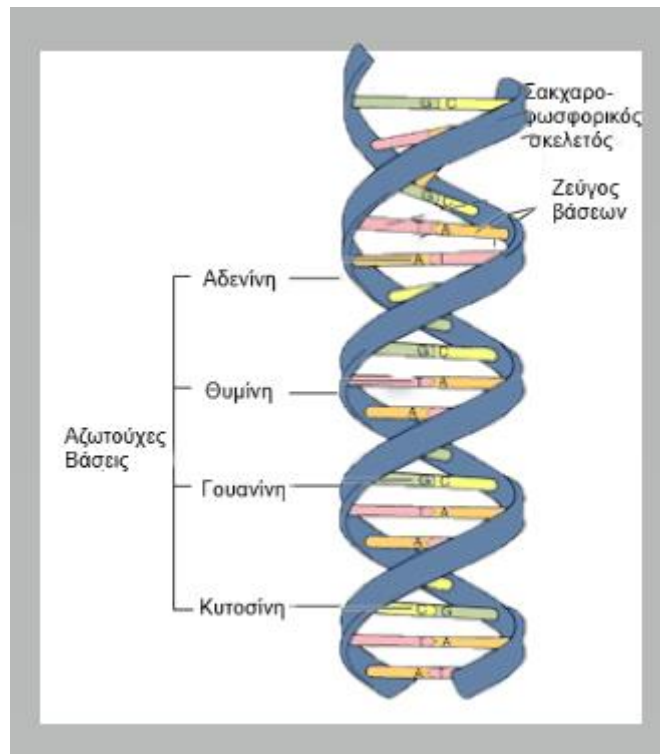
### 2.1 Δομή και βασικά συστατικά του DNA

Το DNA, σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας [1], αποτελεί το αρχείο των γενετικών πληροφοριών, το οποίο μεταφράζεται σε RNA, κι αυτό με τη σειρά του σε πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν το βασικό συστατικό του κυττάρου. Όλες οι κυτταρικές μορφές έχουν αποθηκευμένες τις γενετικές τους πληροφορίες με τη μορφή μιας αλληλουχίας μεταξύ τεσσάρων οργανικών αζωτούχων βάσεων, της αδενίνης (A), της θυμίνης (T), της γουανίνης (G) και της κυτοσίνης (C), από τις οποίες αποτελείται το μακρομόριο το οποίο ονομάζεται δεσόξυ-ριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Το μόριο του DNA οργανώνεται με τη μορφή της διπλής έλικας, όπως προτάθηκε από τους Watson & Crick το 1953 [2]. Σύμφωνα με τη δομή της διπλής έλικας, η οποία απεικονίζεται στην εικόνα 1, το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, σε μορφή αντιτακτών κλώνων που σχηματίζουν δεξιόστροφη έλικα, όπου οι αζωτούχες βάσεις κάθε κλώνου είναι κάθετες προς το επίπεδο της έλικας και προσανατολίζονται προς το εσωτερικό της δομής όντας υδρόφοβες, ενώ ο σκελετός του μορίου αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικής ομάδας-πεντόζης και είναι υδρόφιλος.

Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων. Μεταξύ της αδενίνης και της θυμίνης σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ της γουανίνης και της κυτοσίνης σχηματίζονται τρεις. Οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες είναι συμπληρωματικές, δηλαδή η δομή της μίας καθορίζει τη δομή της άλλης και αντιπαράλληλες, δηλαδή το 3' άκρο της μίας βρίσκεται απέναντι από το 5' άκρο της άλλης [2].

Η γραμμική διαδοχή των ομοιοπολικά συνδεδεμένων τεσσάρων αζωτούχων βάσεων καθορίζει την κωδικοποίηση των γενετικών πληροφοριών. Οι αζωτούχες βάσεις έχει παρατηρηθεί πως συνδυάζονται ανά τρεις, δημιουργώντας  $4^3=64$  συνδυασμούς που ονομάζονται κωδικόνια ή τριπλέτες, οι οποίοι κωδικοποιούν τα 20 αμινοξέα από τα οποία αποτελούνται οι πρωτεΐνες. Λόγω της περισσειας κωδικονίων συγκριτικά με τον αριθμό των αμινοξέων (περισσότερα από ένα κωδικόνια κωδικοποιούν ένα αμινοξύ), ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος.[17]



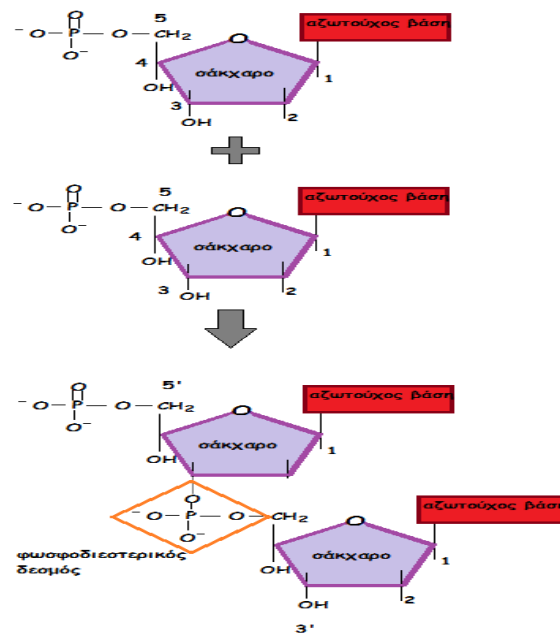


Εικόνα Θ2-1: Η δομή της Διπλής έλικας του DNA. Πηγή: National Human Genome Research Institute, UK

## 2.2 Η δομή των νουκλεοτιδίων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, βασικό δομικό συστατικό της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας από την οποία αποτελούνται τα νουκλεϊκά οξέα, όπως το DNA, είναι το νουκλεοτίδιο. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα Θ2-2**, κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από τρία τμήματα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό: μία αζωτούχα βάση, ένα σάκχαρο το οποίο είναι πεντόζη και ένα έως τρία μόρια φωσφορικού οξέος. Τα τρία αυτά μέρη ενώνονται με δύο αντιδράσεις συμπύκνωσης. Οι αζωτούχες βάσεις στο μόριο του DNA μπορούν να είναι είτε πουρίνες, όπως η αδενίνη και η γουανίνη, είτε πυριμιδίνες, όπως η θυμίνη και η κυτοσίνη. Οι πουρίνες προκύπτουν από την ένωση ενός πυριμιδινικού κι ενός ιμιδαζολικού δακτυλίου. Η ένωση μίας βάσης με το σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοσίδιο. Ένα νουκλεοσίδιο του DNA μπορεί να αποτελείται από μία από τις βάσεις και μία δεσοξυριβόζη (πχ. η αδενίνη μαζί με τη δεσοξυριβόζη σχηματίζουν την αδενοσίνη). Όταν μία τουλάχιστον φωσφορική ομάδα ενώνεται με το νουκλεοσίδιο σχηματίζεται το νουκλεοτίδιο. Το σάκχαρο και οι φωσφορικές ομάδες αποτελούν τον σταθερό σκελετό της έλικας του DNA και οι αζωτούχες βάσεις είναι στραμμένες προς το εσωτερικό του μορίου, όπως αναφέρθηκε

παραπάνω. Το πρώτο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το 5' άκρο του και ενώνεται από το υδροξύλιο του 3' άνθρακα με τον φώσφορο του 5' άνθρακα του επόμενου νουκλεοτιδίου, μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού που απεικονίζεται στην **Εικόνα Θ2-2**. Το τελευταίο νουκλεοτίδιο θα έχει ελεύθερο το υδροξύλιο στη θέση 3' (προσανατολισμός 5' -> 3')..



Εικόνα Θ2-2: Η δομή των νουκλεοτιδίων και ο φωσφοδιεστερικός δεσμός.

## 2.3 Χρωμοσώματα και Ρύθμιση των Γονιδίων

Το γονιδίωμα του οργανισμού (το σύνολο δηλαδή του γενετικού υλικού) οργανώνεται σε γονίδια τα οποία χαρακτηρίζονται ως το χημικό πολυμερές τεσσάρων αρωματικών αζωτούχων βάσεων, το οποίο περιέχει μια συγκεκριμένη βιολογική πληροφορία. Μόνο ένα μικρό ποσοστό του συνολικού γονιδιώματος ενός κυττάρου περιέχει λειτουργική πληροφορία, είναι δηλαδή αξιοποιήσιμο μέσω της μεταγραφής σε RNA και της μετάφρασης, για τη σύνθεση των πρωτεϊνών [3]. Το μεγαλύτερο ποσοστό του χρησιμεύει στη ρύθμιση της γονιδιακής ενεργότητας ή και για άγνωστες –μέχρι

στιγμής- λειτουργίες. Για παράδειγμα, γονίδια τα οποία δεν μεταγράφονται σε mRNA<sup>2</sup> και δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες (μέσω των διαδικασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης) μπορεί να μεταγράφονται σε tRNA<sup>3</sup>, rRNA<sup>4</sup> και snRNA<sup>5</sup>, τα οποία είναι απαραίτητα για τη γονιδιακή έκφραση. Άλλη μία σημαντική πληροφορία που προέκυψε από τη μελέτη της δομικής οργάνωσης των γονιδίων είναι η ασυνέχεια της γενετικής πληροφορίας [4]. Ανάμεσα στα εξώνια, τις κωδικές δηλαδή περιοχές που εμπεριέχουν πληροφορία, παρεμβάλλονται τα εσώνια, μη κωδικές περιοχές οι οποίες αποκόπτονται από εξειδικευμένα μοριακά συμπλέγματα, τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNPs), μικρά πυρηνικά RNA (snRNAs) και ετερογενή πυρηνικά μόρια RNA (hnRNA). Το τελικό μεταφραζόμενο mRNA προκύπτει από την αποκοπή των εσωνίων και τη συρραφή των εξωνίων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται συναρμογή. Τα γονίδια οργανώνονται σε δομές που αποτελούνται από DNA και πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται χρωμοσώματα [5]. Τα χρωμοσώματα στα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελούνται από μεγάλα γραμμικά μόρια DNA και πρωτεΐνες οι οποίες έχουν το ρόλο να συσκευάζουν το DNA στις διάφορες μορφές που θα αναλυθούν παρακάτω και να ελέγχουν τις λειτουργίες του. Τα χρωμοσώματα όταν βρίσκονται στην πιο συμπυκνωμένη μορφή τους, κατά τη διαδικασία της μετάφρασης, είναι ορατά από το οπτικό μικροσκόπιο. Όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 1, πριν τοποθετηθούν στη μιτωτική άτρακτο, τα χρωμοσώματα διπλασιάζονται και οι δύο αδελφές χρωματίδες ενώνονται στο κεντρομερίδιο τους, οδηγώντας σε ένα σχήμα που μοιάζει με το γράμμα Χ (μεταφασικό χρωμόσωμα).

### 2.3.1 Χρωματίνη: Ευχρωματίνη και Ετεροχρωματίνη

Τα χρωμοσώματα των ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελούνται από ινίδια χρωματίνης, όπου το κάθε ένα από αυτά, αποτελείται από νουκλεοσώματα. Κάθε νουκλεόσωμα είναι ένα οκταμερές ιστονών, οι οποίες δεν είναι οι ίδιες απαραίτητα σε κάθε ένα από αυτά. Γύρω από κάθε οκταμερές τυλίγεται ένα τμήμα DNA μήκους ~146 ζευγών βάσεων (basepair –bp). Οι ίνες χρωματίνης οργανώνονται σε χρωματίνη, με τη βοήθεια συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Ως χρωματίνη ορίζουμε το σύμπλεγμα του χρωμοσωμικού DNA με τις πυρηνικές πρωτεΐνες καθώς και με το πρόδρομο hnRNA. Οι πυρηνικές

---

<sup>2</sup>Αγγελιαφόρο RNA ή mRNA είναι το RNA που μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA στα ριβοσώματα για την πρωτεϊνοσύνθεση των κυττάρων.

<sup>3</sup> Το Μεταφορικό RNA ή tRNA είναι μικρή αλυσίδα RNA, που μεταφέρει ειδικά αμινοξέα σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου, με βάση τις οδηγίες του αγγελιαφόρου RNA, έτσι ώστε να γίνει η πρωτεϊνοσύνθεση κατά τη διάρκεια της μετάφρασης στο κύτταρο

<sup>4</sup> Το Ριβοσωμικό RNA ή rRNA είναι ένας τύπος RNA των ριβοσωμάτων που καταλύει την πρωτεϊνοσύνθεση στο κύτταρο.

<sup>5</sup> Το μικροπυρηνικό RNA ή snRNA, είναι μικρά μόρια RNA, τα οποία συνδέονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία καταλύουν την «ωρίμανση» του mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

πρωτεΐνες που ενυπάρχουν στην χρωματίνη χωρίζονται στις ιστόνες και τις μη ιστόνες. Οι ιστόνες είναι οι H<sub>1</sub>, H<sub>2A</sub>, H<sub>2B</sub>, H<sub>3</sub> και H<sub>4</sub>, και ο κύριος ρόλος τους είναι το πακετάρισμα του DNA στα νουκλεοσώματα αλλά και στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Οι μη ιστόνες περιλαμβάνουν δομικές πρωτεΐνες, μεταγραφικά ή μεταφραστικά ένζυμα και ένζυμα που μετέχουν στην πρωτεϊνική ρύθμιση. Κάθε ιστόνη αποτελείται από δύο τομείς, έναν τομέα αναδίπλωσης ιστόνης που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις ιστόνης-ιστόνης και περιβάλλει το DNA γύρω από νουκλεοσώματα και μια αμινοτερματική περιοχή που εκτείνεται στον πυρήνα νουκλεοσωμάτων και εμπλέκεται στην ερμηνεία ρυθμιστικών καθοριστών και DNA. Η χρωματίνη υπάρχει σε όλα σχεδόν τα κύτταρα και εμπεριέχει το σύνολο της γονιδιακής πληροφορίας (με εξαίρεση το μιτοχονδριακό DNA). Λόγω της συμπυκνωμένης φύσης της δομής της χρωματίνης, το DNA μήκους 2m μπορεί να χωρέσει στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, διαμέτρου 10 μm. Η δομή της χρωματίνης είναι ένας κύριος παράγοντας που καθορίζει την ακτινοευαισθησία και την επιδιόρθωση του DNA στα ανθρώπινα κύτταρα. Η χρωματίνη είναι στην πραγματικότητα ένα δυναμικό και ετερογενές υπόστρωμα για την επιδιόρθωση του DNA που ρυθμίζεται από τροποποιήσεις στην αλληλεπίδραση επιγονιδιωμάτων<sup>6</sup> και άλλων πρωτεϊνών / DNA [27].

Έχοντας σαν εργαλείο την παράμετρο Pcl<sub>c</sub>, στο υπολογιστικό μέρος της εργασίας, μελετήσαμε τον εντοπισμό της επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων σε σχέση με την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Ακόμα, μελετάται η σύνδεση των επαγόμενων εστιών (foci) γH2AX συναρτήσει των δόσεων της γ-ακτινοβολίας και του χρόνου.

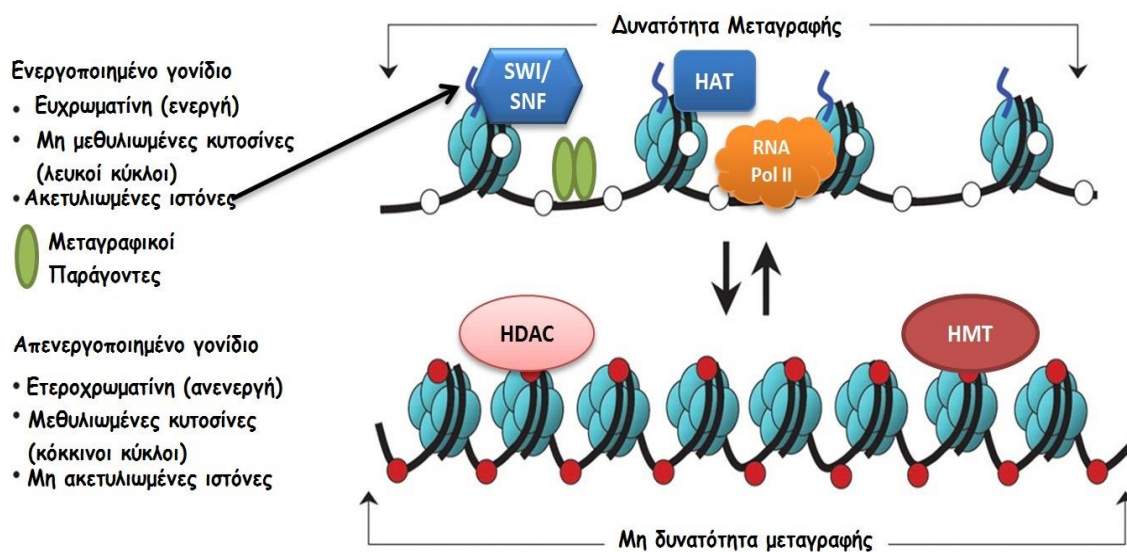
Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, η οποία αποτελεί και το μεγαλύτερο χρονικά τμήμα της ζωής ενός κυττάρου, η χρωματίνη είναι παρούσα σε δύο μορφές: την ευχρωματίνη, η οποία αποτελείται από ενεργά τμήματα DNA και την ετεροχρωματίνη, η οποία αποτελείται από ανενεργά τμήματα DNA. Αυτοί οι δύο τύποι χρωματίνης αντιπροσωπεύουν δύο ξεχωριστά γονιδιωματικά και πυρηνικά πεδία που διακρίνονται από διάφορες ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των τροποποιήσεων των ιστονών, της προσπελασιμότητας της χρωματίνης, της πυκνότητας του γονιδίου, του χρόνου αντιγραφής και της σύνθεσης της αλληλουχίας του DNA [29].

Όσον αφορά τον χρωμοσωμικό εντοπισμό, η περισσότερη ετεροχρωματίνη συγκεντρώνεται σε περιοχές περικεντρομερικής και τελομερούς σε κύτταρα *Drosophila* και θηλαστικών, ενώ η ευχρωματίνη κατανέμεται κατά μήκος των βραχιόνων χρωμοσωμάτων.

---

<sup>6</sup>Το επιγονιδίωμα είναι ο μηχανισμός με τον οποίο το κύτταρο ελέγχει ανά πάσα χρονική στιγμή ποιες γονιδιακές περιοχές του είναι λειτουργικές, κάτι που επιτυγχάνει είτε προκαλώντας χημικές μετατροπές στην αλυσίδα του DNA είτε αλλάζοντας τοπικά το τρισδιάστατο σχήμα της αλυσίδας.

Η ετεροχρωματίνη, καθώς είναι ανενεργή, είναι πιο συμπυκνωμένη και η διαφορά του βαθμού συμπύκνωσης αποδίδεται μεταξύ άλλων στην διαφορετική ακετυλίωση των ιστονών. Η προσθήκη μιας ομάδας ακετυλίου (CH<sub>3</sub>O-) στην ιστόνη προκαλεί την εξουδετέρωση του θετικού φορτίου του αμινοτελικού της άκρου. Με αυτόν τον τρόπο εξασθενούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το αρνητικά φορτισμένο DNA (λόγω των φωσφορικών ομάδων των νουκλεοτιδίων που περιγράφηκαν παραπάνω) και η ετεροχρωματίνη μετατρέπεται στη μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Θ2-3**.



Εικόνα Θ2-3: Αναδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων και δομές ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης. Πηγή: Wikimedia Commons

### 2.3.1.1 Ευχρωματίνη

Η ευχρωματίνη είναι μία ελαφρώς συμπυκνωμένη μορφή χρωματίνης στην οποία οργανώνονται πολλά γονίδια και είναι συνήθως υπό διαδικασία μεταγραφής [7]. Η ευχρωματίνη είναι η πιο ενεργή μορφή του γονιδιώματος και αποτελεί το 92% του συνόλου του. Η δομή της αποτελείται από ίνες DNA ελαφρώς ξεδιπλωμένες από τα οκταμερή των ιστονών (πιο “χαλαρά” συγκροτημένα νουκλεοσώματα), ώστε να μπορεί να προσπελαστεί το DNA. Η ξεδιπλωμένη δομή επιτρέπει στις γονιδιακές ρυθμιστικές πρωτεΐνες και τα σύμπλοκα RNA πολυμεράσης να προσαρτηθούν στο DNA, ώστε να αρχίσει η διαδικασία μεταγραφής.

Το κύτταρο χρησιμοποιεί το μετασχηματισμό από ευχρωματίνη σε ετεροχρωματίνη ως μέθοδο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης και της αντιγραφής του DNA, δεδομένου ότι

αυτές οι διαδικασίες (αντιγραφή, μεταγραφή) δεν μπορούν να λάβουν χώρα σε περιοχές με υψηλά συμπυκνωμένο DNA, όπως στην περίπτωση της ετεροχρωματίνης.

### 2.3.1.2 Ετεροχρωματίνη

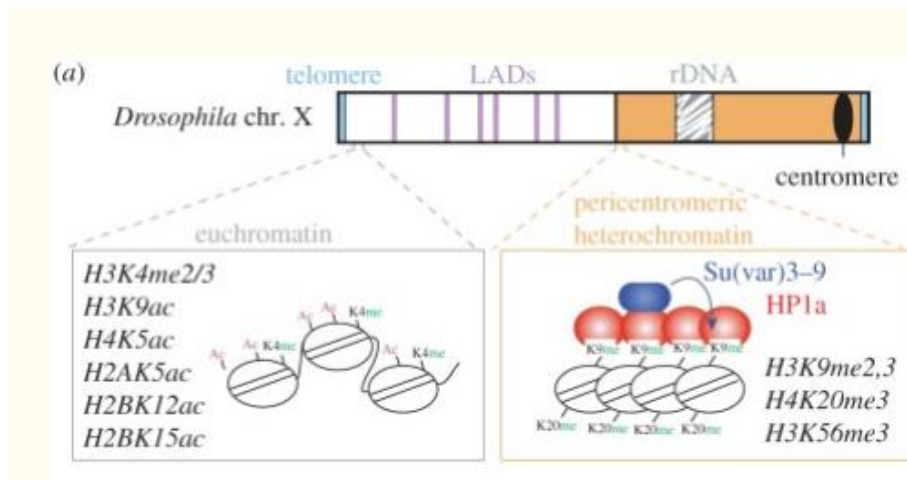
Η ετεροχρωματίνη (από τις ελληνικές λέξεις 'heteros' = διαφορετική και 'chroma' = χρώμα) και εμφανίζεται ως πιο πυκνά κεχρωσμένες περιοχές του πυρήνα εν μέσω ελαφρά χρωματισμένης ευχρωματίνης στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου[28,35].

Η ετεροχρωματίνη είναι μια πολύ συμπυκνωμένη μορφή χρωματίνης η οποία έχει τις επιμέρους δομές της λειτουργικής (facultative) και της συστατικής (constitutive) ετεροχρωματίνης. Ο ρόλος της ετεροχρωματίνης είναι κυρίως ρυθμιστικός αλλά και προστατευτικός για διάφορες περιοχές του γονιδιώματος, καθώς λόγω της υψηλής πυκνώσεως, το DNA σε αυτήν την περιοχή είναι λιγότερο εκτεθειμένο. Κάποιες περιοχές της ετεροχρωματίνης είναι τόσο συμπυκνωμένες ώστε θυμίζουν τα μεταφασικά χρωμοσώματα. Κατά την διχοτόμηση ενός κυττάρου, τα δύο θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν έχουν ετεροχρωματίνη στις ίδιες περιοχές του DNA. Όλα τα κύτταρα του ίδιου είδους έχουν τις ίδιες περιοχές DNA σε μορφή συστατικής ετεροχρωματίνης, άρα όποια γονίδια περιέχονται σε αυτές τις περιοχές θα υποεκφράζονται. [8]. Στους περισσότερους οργανισμούς η περιοχή γύρω από το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος είναι δομημένη στη μορφή της συστατικής ετεροχρωματίνης. Στην περίπτωση της λειτουργικής ετεροχρωματίνης, οι περιοχές του DNA που οργανώνονται σε αυτή τη μορφή διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο. Έτσι μπορεί σε έναν τύπο κυττάρου κάποια γονίδια να είναι στη μορφή της λειτουργικής ετεροχρωματίνης και να υποεκφράζονται, αλλά σε άλλα να βρίσκονται σε μορφή ευχρωματίνης. Επίσης, η λειτουργική ετεροχρωματίνη μπορεί να μετασχηματιστεί σε ευχρωματίνη ως απόκριση σε αντίστοιχο κυτταρικό σήμα.

Η ιστόνη H3, διμεθυλιωμένη ή τριμεθυλιωμένη στη λυσίνη 9, H3K9me2/3<sup>7</sup> απαντάται σε αφθονία σε περιοχές ετεροχρωματίνης. Η H3K9me2/3 έχει συσχετισθεί με την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, επομένως θεωρείται ως δείκτης ετεροχρωματίνης, δηλαδή σιωπηλής χρωματίνης. Η ετεροχρωματίνη επίσης είναι εμπλουτισμένη με συσχετιζόμενες με αυτήν πρωτεΐνες, όπως την πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1a (HP1a) στις μύγες (**Εικόνα Θ2-4**) ή τις αντίστοιχες HP1α και HP1β, όταν πρόκειται για κύτταρα θηλαστικών [28].

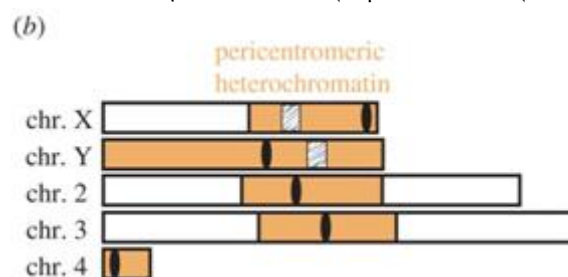
---

<sup>7</sup>H3K9me2/3: Δηλώνει την ιστόνη H3, διμεθυλιωμένη (me2) ή τριμεθυλιωμένη (me3) στη λυσίνη 9 (K9). Το "K" προέρχεται από τη συντόμηση της λυσίνης-Lysine σε "Lys" ή εναλλακτικά σε "K".



Εικόνα Θ2-4. Οργάνωση διαφορετικών τύπων σειριακών ακολουθιών κατά μήκος ενός χρωμοσώματος *Drosophila*, συμπεριλαμβανομένης της διάκρισης χαρακτηριστικών μεταξύ της ευχρωματίνης και της περικεντρομερικής ετεροχρωματίνης όσον αφορά τη συμπύκνωση της χρωματίνης και τις τροποποιήσεις των ιστονών. Τα HP1a και Su (var) 3-9 βρίσκονται σε αφθονία σε περιοχές ετεροχρωματίνης (το βέλος υποδεικνύει ότι το Su (var) 3-9 διατηρεί και διασπείρει την H3K9me2/3 στις περιοχές ετεροχρωματίνης)[28].

Αντιστρόφως, οι τροποποιήσεις της ιστόνης που συσχετίζονται με την «ανοικτή» χρωματίνη και την έκφραση γονιδίων (π.χ. υπερακετυλίωση ιστόνης και H3K4me) γενικά βρίσκονται σε πλούσιες σε γονίδια, ευχρωματικές περιοχές [ 17-20]



Εικόνα Θ2-5:Σχηματική άποψη όλων των χρωμοσωμάτων *Drosophila* που δείχνουν τη θέση και την έκταση της περικεντρομερικής ετεροχρωματίνης.[28]

Η περικεντρομερική ετεροχρωματίνη είναι μια προεξέχουσα χρωμοσωμική δομή που εκτείνεται περίπου στο 30% των γονιδιωμάτων της *Drosophila* και του ανθρώπινου γονιδιώματος [28,31,32], **Εικόνα Θ2-5**, αλλά απουσιάζει από τους ζυμομύκητες<sup>8</sup>. Πιο

<sup>8</sup> Ο *Saccharomyces cerevisiae*, ή αλλιώς εκκολαπτόμενος ζυμομύκητας, είναι ένα γνωστό «μοντέλο» οργανισμού στο εργαστήριο επειδή είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός του οποίου οι κυτταρικές δραστηριότητες μοιάζουν πολύ περισσότερο με των ανθρώπων, από όσο εκείνες ενός βακτηρίου, όπως το *E. Coli*. Ο ζυμομύκητας μπορεί να ζει είτε με δύο αντίγραφα του γονιδιώματος (διπλοειδής) είτε με ένα (απλοειδής) και σε κάθε περίπτωση, αναπαράγεται με μίτωση.

συγκεκριμένα, η περικεντρομερική ετεροχρωματίνη καθυστερεί να αναπαράγεται στους περισσότερους οργανισμούς [32] αλλά είναι λειτουργικά και δομικά διακριτή από τα όψιμα αντιγραφόμενα ελασματοειδή πεδία (LAD) που κατανέμονται κατά μήκος των βραχιόνων χρωμοσωμάτων. Η περικεντρομερική ετεροχρωματίνη αποτελείται κυρίως από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA [27-30]. Στη *Drosophila*, για παράδειγμα, περίπου οι μισές από αυτές τις αλληλουχίες είναι «δορυφορικές» επαναλήψεις, κυρίως 5 αλληλουχίες ζευγών βάσεων που επαναλαμβάνονται διαδοχικά για εκατοντάδες κιλοβάσεις έως και για μεγαβάσεις, ενώ το υπόλοιπο της ετεροχρωματίνης περιέχει ομαδοποιημένα συσσωματώματα μεταθετών στοιχείων και περίπου 250 απομονωμένα γονίδια. Η ετεροχρωματίνη είναι πιθανόν να διατηρείται στα κύτταρα λόγω των κρίσιμων ρόλων της στη λειτουργία κεντρομερούς, της ένωσης των δύο αδελφών χρωματίδων [33,34] και της γονιδιακής οργάνωσης [28,32], αλλά η αφθονία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, αυξάνει τον όγκο του γονιδιώματος, που θα πρέπει να διορθωθεί και να παραμείνει χωρίς βλάβες.

Για παράδειγμα, το ένα από τα δύο X χρωμοσώματα των θηλυκών θηλαστικών είναι αδρανές σε μορφή λειτουργικής ετεροχρωματίνης, μπορεί όμως να ξαναγίνει ενεργό στην περίπτωση της γαμετογένεσης<sup>9</sup> [8]. Παρόλο που η ετεροχρωματίνη έχει σχεδόν ταυτιστεί με την επιγενετική σίγαση των γονιδίων, υπάρχουν φορές που σχετίζεται με την ακριβώς αντίθετη λειτουργία, δηλαδή την έκφραση κάποιων γονιδίων.

### 2.3.2 Αναδιάπλαση της Χρωματίνης

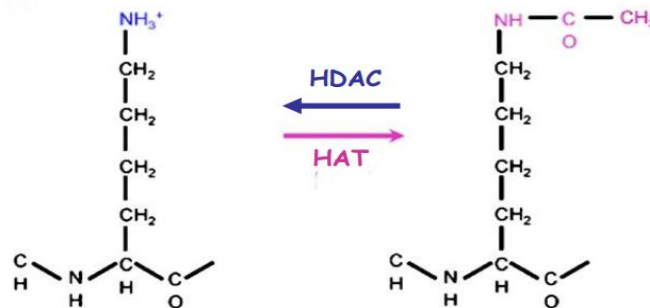
Όπως έχει ήδη περιγραφεί, η χρωματίνη είναι δυνατό να αλλάζει μορφές συμπύκνωσης και να μετασχηματίζεται από αδρανή ετεροχρωματίνη στην πιο χαλαρή δομή της ενεργής ευχρωματίνης. Η διαδικασία αυτή λέγεται αναδιάπλαση χρωματίνης και επιτυγχάνεται μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων. Οι πιο συνήθεις τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε αυτήν τη διαδικασία είναι: α) τροποποιήσεις στις “ουρές” των ιστονών μέσω ειδικών ενζύμων, όπως οι ιστονικές ακετυλοτρανσφεράσες (HAT), οι αποακετυλάσες, οι μεθυλοτρανσφεράσες και οι κινάσες και β) αναδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων από ATP-εξαρτώμενα συμπλέγματα αναδιάπλασης της χρωματίνης. Στην πρώτη περίπτωση, διάφορα ένζυμα προκαλούν χημικές μεταβολές στις ιστόνες με σκοπό την περαιτέρω συμπύκνωση ή χαλάρωση της μορφής του νουκλεοσώματος, από την οποία εξαρτάται και η ικανότητα ή μη πρόσδεσης διαφόρων μεταγραφικών ενζύμων, και άρα η ενεργή ή ανενεργή μορφή που έχει το DNA [13]. Συγκεκριμένα, μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών, **Εικόνα 02-6**, η δομή του νουκλεοσώματος γίνεται

---

<sup>9</sup>Γαμετογένεση ονομάζεται η παραγωγή απλοειδών γεννητικών κυττάρων (γαμετών), δηλαδή ωαρίων και σπερματοζωαρίων σε οργανισμούς που αναπαράγονται αμφιγονικά.



πιο χαλαρή και δίνεται η δυνατότητα στους μεταγραφικούς παράγοντες (TF-Transcription Factors) να προσδεθούν στο DNA.



Εικόνα Θ2-6: Ακετυλίωση Ιστονής

Εν αντιθέσει, η μεθυλίωση συγκεκριμένων αμινοξέων των ιστονών (συγκεκριμένα της λυσίνης των ιστονών H3 και H4) προκαλεί μεγαλύτερη πυκνωση της δομής του DNA γύρω από τις ιστονές αποτρέποντας τη μεταγραφή και την έκφραση των γονιδίων [14]. Οι περισσότερες αυτές χημικές ομοιοπολικές τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα στο N-τελικό άκρο των ιστονών του νουκλεοσώματος [15].

Στην περίπτωση της αναδιοργάνωσης των νουκλεοσωμάτων από τα ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα, η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται μέσω της αποκοπής, μετακίνησης ή τροποποίησης των νουκλεοσωμάτων. Υπάρχουν πέντε γνωστά τέτοια σύμπλοκα που δρουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα (SWI/SNF, ISWI, NuRD/Mi-2/CHD, INO80 and SWR1) και όλα έχουν ως κοινό στοιχείο μια καταλυτική περιοχή ATP η οποία εξασφαλίζει ενέργεια στο σύμπλοκο υδρολύοντας την ATP. Τα σύμπλοκα αυτά εξειδικεύονται σε διαφορετικές λειτουργίες και διαφοροποιούνται έχοντας το καθένα ένα μοναδικό πρωτεϊνικό τομέα στην περιοχή της ATP[16]. Μερικές από τις λειτουργίες στις οποίες εξειδικεύονται τα παραπάνω σύμπλοκα είναι η οργάνωση των νουκλεοσωμάτων σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους, η επανασυναρμολόγηση της χρωματίνης έπειτα από αντιγραφή τμήματος DNA καθώς και η επιδιόρθωση της διπλής έλικας [15,16].

## 2.4 Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας: Αντιγραφή, Μεταγραφή και Μετάφραση του DNA

Η ροή των γενετικών πληροφοριών αποτελεί το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας, το οποίο περιλαμβάνει τις διαδικασίες της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης.

### 2.4.1 Η Αντιγραφή

Η αντιγραφή του ευκαρυωτικού γονιδιώματος είναι μία ημισυντηρητική διαδικασία<sup>10</sup>, η οποία λαμβάνει χώρα ασυνεχώς σε αυτόνομες αντιγραφικές μονάδες (αντιγραφόνια/ρεπλικόνια-replicons). Κάθε μητρική αλυσίδα του αρχικού δίκλωνου μορίου DNA λειτουργεί ως υπόστρωμα για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στη δημιουργία δύο θυγατρικών μορίων για κάθε αρχικό μόριο DNA που αντιγράφεται. Η αντιγραφή του DNA είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για τη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας στους οργανισμούς και πρέπει να γίνεται ταχύτατα και με όσο το δυνατόν λιγότερα σφάλματα [17]. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, επιστρατεύονται πολλά διαφορετικά ένζυμα και πρωτεΐνες, με το πιο βασικό να είναι οι DNA πολυμεράσες, οι οποίες συνδέονται στον αντιγραφόμενο κλώνο και προσθέτουν τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια, δημιουργώντας τη συμπληρωματική αλυσίδα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν πέντε τύπους DNA πολυμερασών, τις  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, και  $\epsilon$ -, οι οποίες εντοπίζονται στον κυτταρικό πυρήνα, με εξαίρεση τη  $\gamma$ -πολυμεράση, που εντοπίζεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου και είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA. Όλες οι γνωστές DNA πολυμεράσες εμφανίζουν κάποιες κοινές ενζυμικές ιδιότητες. Λειτουργούν μόνο πάνω σε μια αλυσίδα πρότυπο και μπορούν να συνθέτουν τη νέα αλυσίδα DNA μόνο στην κατεύθυνση 5' προς 3', προσθέτοντας το νεο-εισερχόμενο dNTP (5'-τριφωσφορικό-δεσοξυ-ριβονουκλεοτίδιο) στη θέση της 3'-υδροξυλικής ομάδας της αναπτυσσόμενης αλυσίδας. Γι' αυτόν το λόγο η μία αλυσίδα (η 3' προς 5') καλείται αλυσίδα οδηγός και αντιγράφεται συνεχώς, ενώ η συμπληρωματική της καλείται συνοδός αλυσίδα και αντιγράφεται ασυνεχώς [17]. Επίσης, όλες οι DNA πολυμεράσες χρειάζονται μια προσχηματισμένη αλυσίδα εκκινήτη (primer) [18], η οποία συνδέεται πρώτη με τη μητρική αλυσίδα ώστε να αρχίσουν να συνδέονται τα dNTPs. Η διαδικασία πρόσθεσης νουκλεοτιδίων είναι μια ενδόθερμη διαδικασία, απαιτεί δηλαδή ενέργεια η οποία βρίσκεται με τη μορφή τριών φωσφορικών ομάδων, συνδεδεμένων με τα νουκλεοτίδια. Κατά τη διάσπαση του δεσμού των δύο φωσφορικών ομάδων, εκλύεται ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του νεοεισερχόμενου νουκλεοτιδίου και της ήδη υπάρχουσας νουκλεοτιδικής αλυσίδας [19].

---

<sup>10</sup>Κάθε αλυσίδα λειτουργεί σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας. Έτσι τα δύο θυγατρικά μόρια που προκύπτουν είναι πανομοιότυπα με το μητρικό και καθένα αποτελείται από μια παλιά και μια καινούργια αλυσίδα. Ο λεγόμενος ημισυντηρητικός μηχανισμός αντιγραφής.

Η διαδικασία της αντιγραφής εκκινά με την επίδραση της DNA ελικάσης, η οποία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τη διπλή έλικα του DNA προκαλώντας μια τοπική αποελίκωση η οποία οδηγεί στη δομή της αντιγραφικής θηλιάς. Ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται SSBs (Single Stranded DNA-Binding proteins) συνδέονται με τα μονόκλινα DNA και τα σταθεροποιούν ώστε να μην επανασχηματίσουν τη δομή της διπλής έλικας όσο διαρκεί η διαδικασία της αντιγραφής. Όταν λοιπόν ένα τμήμα DNA αντιγράφεται δημιουργείται μία διχάλα αντιγραφής, η οποία αποτελείται από το πατρικό DNA, τις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες και τα ειδικά ένζυμα που παίρνουν μέρος στη διαδικασία. Εφόσον οι δύο αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες, η μία από τις δύο νέες αλυσίδες ακολουθεί την κίνηση της διχάλας διπλασιασμού (αλυσίδα οδηγός), ενώ η αντιπαράλληλή της (αλυσίδα συνοδός) πρέπει να ακολουθεί στη σύνθεσή της την αντίθετη φορά, το οποίο όμως δε συμβαίνει. Η αλυσίδα συνοδός συντίθεται με διακοπτόμενο και ασυνεχή τρόπο προς την κίνηση της διχάλας διπλασιασμού. Τα νεοσυντιθέμενα μικρά τμήματα DNA που προκύπτουν ονομάζονται κομμάτια Okazaki. Μία DNA νουκλεάση συνδέεται στον αντιγραφόμενο κλώνο και υδρολύει τους εκκινητές κι έπειτα μία πολυμεράση επιδιόρθωσης πολυμερίζει τα dNTPs ώστε να καλυφθούν τα κενά τμήματα που προκύπτουν στη συνοδό αλυσίδα από την υδρόλυση των τμημάτων RNA. Τέλος τα κομμάτια Okazaki συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός ειδικού ενζύμου που ονομάζεται συνδετάση ή λιγκάση, δημιουργώντας μια ενιαία αλυσίδα [20,21]. Τα τελικά άκρα των χρωμοσωμάτων αντιγράφονται από μία άλλη ειδική πρωτεΐνη που ονομάζεται τελομεράση.

Η DNA πολυμεράση είναι ένα εξαιρετικά ακριβές ένζυμο το οποίο κάνει περίπου ένα λάθος σε κάθε  $10^7$  αντιγραφές και διαθέτει μηχανισμό όπου ελέγχει και διορθώνει μόνη της ενδεχόμενα λάθη στην τοποθέτηση νουκλεοτιδίων [17]. Σε δεύτερο χρόνο επιδρούν ειδικά διορθωτικά ένζυμα ώστε να διορθώσουν όποια λάθη διέφυγαν τον πρώτο έλεγχο της DNA πολυμεράσης κι έτσι η διαδικασία της αντιγραφής έχει τελική πιθανότητα λάθους ένα στα  $10^{10}$  νουκλεοτίδια.

## 2.4.2 Η Μεταγραφή

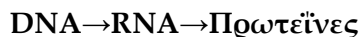
Η μεταγραφή του DNA σε RNA αποτελεί το πρώτο βήμα της πρωτεϊνικής έκφρασης και τα διακριτά πρότυπα γονιδιακής ενεργοποίησης και έκφρασης σε κάθε κυτταρικό τύπο, τα οποία είναι αυτά που καθορίζουν τις διαφορετικές λειτουργίες των κυττάρων ενός οργανισμού. Ο στόχος της μεταγραφής είναι η δημιουργία ενός αντιγράφου της

αλληλουχίας ενός γονιδίου σε μορφή RNA. Το μόριο RNA που προκύπτει διαθέτει όλη την πληροφορία που χρειάζεται για τη δημιουργία ενός πολυπεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης. Το κυριότερο ένζυμο που ευθύνεται για τη λειτουργία της μεταγραφής είναι η RNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί τον ένα κλώνο του DNA για να συνθέσει μια συμπληρωματική αλυσίδα RNA σε κατεύθυνση 5' προς 3', προσθέτοντας ένα νέο 5' – τριφωσφορικό- ριβονουκλεοτίδιο (rNTP) στο 3' άκρο της αλυσίδας με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων του DNA υποστρώματος. Σε αντίθεση με τις DNA πολυμεράσες που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, οι RNA πολυμεράσες δεν χρειάζονται εκκινητή για την ενεργοποίηση των ενζυμικών τους ιδιοτήτων και προχωρούν στη μεταγραφή μόνο της μίας αλυσίδας DNA σε RNA. Η μεταγραφή ενός γονιδίου λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια, την έναρξη, την επιμήκυνση και τον τερματισμό. Κατά την έναρξη, η RNA πολυμεράση προσδένεται δια μέσου της εκλεκτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του μορίου της και ειδικών ρυθμιστικών αλληλουχιών στο 5' άκρο κάθε γονιδίου, σε μια περιοχή που καλείται υποκινητής. Κάθε γονίδιο έχει το δικό του υποκινητή, η θέση του οποίου καθορίζει ποια από τις δύο αλυσίδες θα μεταγραφεί (κωδική αλυσίδα). Η σύνδεση του ενζύμου προκαλεί αποδιάταξη στο μόριο του DNA ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ο ένας κλώνος ως υπόστρωμα. Κατά την προσπέλαση του υποστρώματος από την RNA πολυμεράση, το ένζυμο δημιουργεί ένα μόριο RNA από συμπληρωματικά νουκλεοτίδια που συνδέονται με 3' προς 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό [17]. Το RNA που προκύπτει είναι όμοιο με την κωδική αλυσίδα του DNA (την συμπληρωματική αλυσίδα του υποστρώματος) αλλά διαθέτει την αζωτούχα βάση ουρακίλη στη θέση της θυμίνης του DNA [21]. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να εμφανιστεί κάποια από τις ειδικές αλληλουχίες λήξης, που σηματοδοτεί τον τερματισμό της μεταγραφής [22].

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το παραγόμενο RNA λέγεται hnRNA (heterogenous nuclear RNA) και χρειάζεται να υποβληθεί σε μία ακόμη διαδικασία πριν να είναι έτοιμο προς μετάφραση, η οποία καλείται ωρίμανση ή συναρμογή. Η ωρίμανση λαμβάνει χώρα στα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα (RNPs) τα οποία αποκόπτουν τις μη κωδικές περιοχές του hnRNA (εσώνια) και συγκολλούν τις κωδικές (εξώνια) και δημιουργούν τα ώριμα mRNA τα οποία στη συνέχεια θα μεταφραστούν σε πολυπεπτίδια. Από το συνολικό hnRNA μόνο το 5% διαθέτει κωδική πληροφορία και οδηγείται σε μετάφραση.

### 2.4.3 Η Μετάφραση

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας συνοψίζεται στο σχήμα:



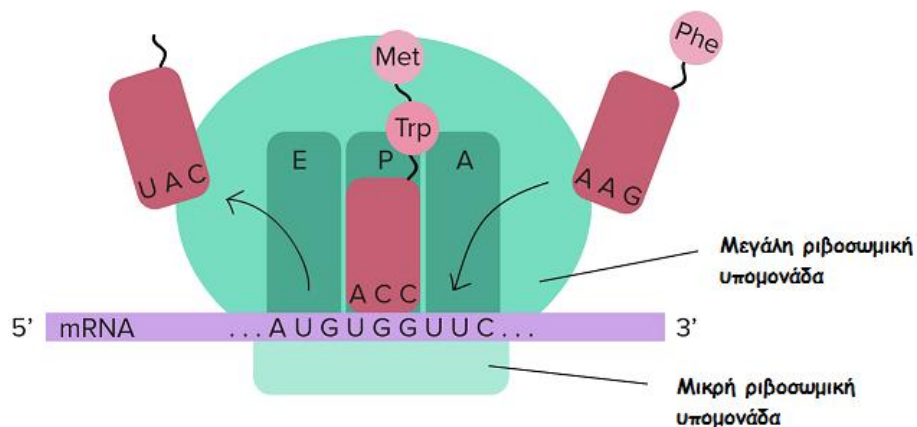
Η βασική, λοιπόν, διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης, αυτή κατά την οποία το ώριμο mRNA μετατρέπεται σε πρωτεΐνη (ή ακριβέστερα, σε πολυπεπίδιο που μπορεί να αποτελεί τμήμα της τελικής πρωτεΐνης) ονομάζεται μετάφραση. Κατά τη μετάφραση, το κύτταρο αποκρυπτογραφεί την πληροφορία που βρίσκεται αποθηκευμένη στο mRNA μέσω του γενετικού κώδικα, ενός κώδικα που αντιστοιχίζει τριπλέτες νουκλεοτιδίων (τα κωδικόνια) με ένα ή περισσότερα αμινοξέα. Ο γενετικός κώδικας παρουσιάζεται αναλυτικά στην **Εικόνα Θ2-7**.

		δεύτερο γράμμα				
		U	C	A	G	
π ρ ώ τ ο  γ ρ ά μ μ α	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } <b>AUG Met</b>	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Εικόνα Θ2-7: Ο γενετικός κώδικας. Πηγή: Τροποποιημένη από Open Stax College Biology

Υπάρχουν 61 κωδικόνια για τα 21 αμινοξέα που απαρτίζουν τις πρωτεΐνες ή που σημαίνουν την έναρξη ή τη λήξη της διαδικασίας της μετάφρασης. Πιο συγκεκριμένα, το κωδικόνιο AUG αντιστοιχεί στο αμινοξύ μεθιονίνη, αλλά και στην έναρξη της μετάφρασης. Τα κωδικόνια UAA, UAG και UGA δεν αντιστοιχούν σε κανένα αμινοξύ αλλά δίνουν το σήμα της λήξης της μετάφρασης και ονομάζονται κωδικόνια λήξης (stop codons) [23].

Η μετάφραση επιτελείται κατά βάση από δύο τύπους μορίων. Το ριβόσωμα, το οποίο στην πραγματικότητα είναι ένα ενζυματικό σύμπλοκο που αποτελείται κατά το 1/3 από πρωτεΐνες και κατά τα 2/3 ριβοσωμικό RNA (rRNA), και το μεταφορικό RNA (tRNA). Ο χώρος που λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μετάφρασης είναι το ριβοσωμικό σύμπλεγμα, το οποίο επίσης καταλύει την αντίδραση σύνδεσης δύο πεπτιδίων ώστε να σχηματιστεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης. Το ριβόσωμα αποτελείται από δύο τμήματα, τη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα. Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, οι δύο υπομονάδες έρχονται κοντά, γύρω από ένα μόριο mRNA και δημιουργούν το σύμπλεγμα έναρξης [24]. Το mRNA “διαβάζεται” από το ριβόσωμα ανά κωδικόνιο και για κάθε κωδικόνιο το αντίστοιχο tRNA μεταφέρει το κατάλληλο αμινοξύ[25].



Εικόνα Θ2-8: Το ριβόσωμα. Πηγή: Τροποποιημένη από Open Stax College Biology

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα Θ2-8**, το ριβόσωμα έχει ειδικές θέσεις για το tRNA, τις θέσεις A, P και E. Το tRNA κινείται μεταξύ αυτών των τριών θέσεων καθώς παραδίδει τα αμινοξέα και χτίζεται η πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αρχικά, συνδέεται στη θέση A μέσω του αντικωδικονίου που φέρει, δηλαδή μέσω της συμπληρωματικής αλληλουχίας αζωτούχων βάσεων που αντιστοιχεί στην αλληλουχία της τριπλέτας του mRNA που “διαβάζεται”. Έπειτα, προχωρά στη θέση P όπου λαμβάνει χώρα η σύνδεση των πεπτιδίων καταλύομενη από ειδικές πρωτεΐνες του ριβοσώματος και στη συνέχεια καταλαμβάνει τη θέση E όπου και αποσυνδέεται από το ριβόσωμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας είναι το ριβόσωμα που κινείται πάνω στο mRNA που προκαλεί την αλλαγή των θέσεων του tRNA. Σε κάθε τέτοια κίνηση του ριβοσώματος, εμφανίζεται ένα νέο κωδικόνιο του mRNA που αντιστοιχεί στο επόμενο αμινοξύ κι ένα νέο μόριο tRNA συνδέεται στη θέση A του ριβοσώματος, για να μετακινηθεί έπειτα στη

θέση P όπου θα σχηματιστεί ο πεπτιδικός δεσμός και θα επιμηκυνθεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα. Στη θέση P, το αμινοξύ που βρισκόταν στο πρώτο tRNA (δηλαδή η μεθειονίνη), θα συνδεθεί με το αμινοξύ του δεύτερου tRNA κι έτσι το πρώτο tRNA ελεύθερο αμινοξέος θα μετακινηθεί στη θέση E και θα φύγει από το ριβόσωμα. Η μεθειονίνη αποτελεί το N-τελικό (άμινο-τελικό) άκρο του πεπτιδίου και το επόμενο αμινοξύ θα αποτελέσει το C-τελικό (καρβοξυτελικό) άκρο του. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται και η πολυπεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνεται έως ότου εμφανιστεί στην αλληλουχία του mRNA κάποιο από τα τρία κωδικόνια λήξης. Τα κωδικόνια λήξης αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες που καλούνται παράγοντες απελευθέρωσης και δίνουν το σήμα λήξης της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης. Όταν ληφθεί αυτό το σήμα, οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού τοποθετούν αντί για αμινοξύ, ένα μόριο νερού στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου και η νεοσχηματισθείσα πρωτεϊνική αλυσίδα απελευθερώνεται από το ριβόσωμα [26]. Η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης ολοκληρώνεται με τις μετα-μεταφραστικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μέχρι το σχηματισμό της τελικής μορφής της πρωτεΐνης.

## Βιβλιογραφία

1. Crick, Francis (August 1970). "Central dogma of molecular biology". *Nature*. 227 (5258): 561–3.
2. Watson, J. D., & Crick, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738 (1953)
3. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann AA, Levine M, Losick RM (2013). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Pearson.
4. Brosius, J (2009), "The Fragmented Gene", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1178: 186–193
5. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann AA, Levine M, Losick RM (2013). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Pearson.
6. Schleyden, M. J. (1847). *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*
7. "Finishing the euchromatic sequence of the human genome". *Nature*. 431 (7011): 931–45. 21 October 2004.
8. Grewal SI, Jia S. 2007 Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8, 35 – 46.
9. Greil, F. et al. Distinct HP1 and Su(var)3–9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes Dev.* 17, 2825–2838
10. Piacentini, L., Fanti, L., Berloco, M., Perrini, B. & Pimpinelli, S. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J. Cell Biol.* 161, 707–714 (2003).
11. Cryderman, D. E. et al. Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev. Dyn.* 232, 767–774 (2005).
12. Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A. & Blobel, G. A. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* 19, 381–391 (2005).
13. Hublitz P, Albert M, Peters A (28 April 2009). "Mechanisms of Transcriptional Repression by Histone Lysine Methylation". *The International Journal of Developmental Biology*. Basel. 10 (1387): 335–354.
14. Strahl BD, Allis CD (January 2000). "The language of covalent histone modifications". *Nature*. 403 (6765): 41–5.
15. Wang GG, Allis CD, Chi P (September 2007). "Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications". *Trends in Molecular Medicine*. 13 (9): 363–72.
16. Wang GG, Allis CD, Chi P (September 2007). "Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling". *Trends in Molecular Medicine*. 13 (9): 373–80.
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "5DNA Replication, Repair, and Recombination". *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. ISBN 0-8153-3218-1
18. Barry, Elizabeth R.; Bell, Stephen D. (8 December 2006). "DNA Replication in the Archaea". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70 (4): 876–887.
19. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-3136-3.12.1.



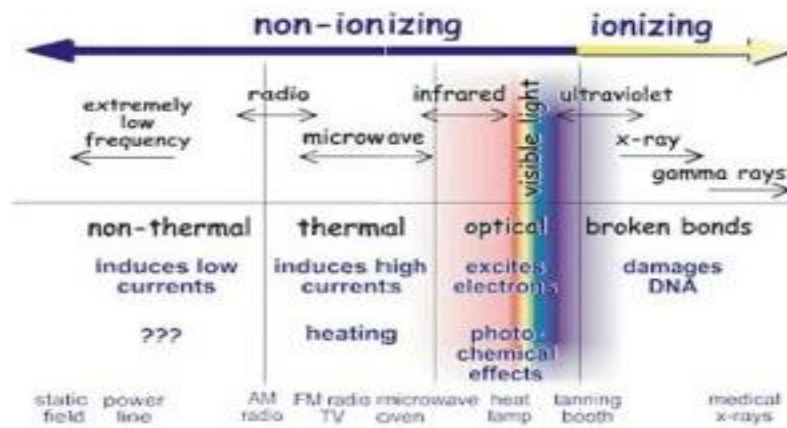
General Features of Chromosomal Replication: Three Common Features of Replication Origins

20. Weigel C, Schmidt A, Rückert B, Lurz R, Messer W (November 1997). "DnaA protein binding to individual DnaA boxes in the Escherichia coli replication origin, oriC". *The EMBO Journal*. 16 (21): 6574–83.
21. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann AA, Levine M, Losick RM (2013). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Pearson.
22. Richardson JP (September 2002). "Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577 (2): 251–260.
23. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). Translation is the RNA-directed synthesis of a polypeptide: A closer look. In *Campbell biology* (10th ed., p. 350). San Francisco, CA: Pearson.
24. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002). Eukaryotic protein synthesis differs from prokaryotic protein synthesis primarily in translation initiation. In *Biochemistry*. (5th ed., section 29.5.1). New York, NY: W. H. Freeman.
25. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002). Protein factors play key roles in protein synthesis. In *Biochemistry*. (5th ed., section 29.4.1). New York, NY: W. H. Freeman
26. Marintchev, A. and Wagner, G. (2004). Translation initiation: Structures, mechanisms, and evolution. In *Quarterly Reviews of Biophysics*, 37(3/4), 214-215.
27. T C Karagiannis, H Kn & A El-Osta(2007). Disparity of histone deacetylase inhibition on repair of radiation-induced DNA damage on euchromatin and constitutive heterochromatin compartments.
28. P. Christopher Caridi, Laetitia Delabaere, Grzegorz Zapotoczny, Irene Chiolo (2017). And yet, it moves: nuclear and chromatin dynamics of a heterochromatic double-strand break
29. James TC, Eissenberg JC, Craig C, Dietrich V, Hobson A, Elgin SC. 1989. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 170–180
30. Mod EC, et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science* 330, 1787–1797.
31. Hoskins RA, et al. 2007. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 316, 1625–1628. (doi:10.1126/science.1139816) [PMC free article][PubMed]
32. Hoskins RA, et al. 2015. The Release 6 reference sequence of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.* 25, 445–458. (doi:10.1101/gr.185579.114)
33. Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. 2001. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294, 2539–2542. (doi:10.1126/science.1064027) [PubMed]
34. Hahn M, et al. 2013. Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev.* 27, 859–872. (doi:10.1101/gad.210377.112) [PMC free article][PubMed]
35. Irene Chiolo,<sup>1,\*</sup> Aki Minoda,<sup>1</sup> Serafin U. Colmenares,<sup>1</sup> Aris Polyzos,<sup>1</sup> Sylvain V. Costes,<sup>1</sup> and Gary H. Karpen<sup>1,2</sup> Double-Strand Breaks in Heterochromatin Move Outside of a Dynamic HP1a Domain to Complete Recombination Repair, 2012

# Κεφάλαιο 3: Βλάβες DNA από ακτινοβολία

## 3.1 Γενικά για την Ιοντίζουσα Ακτινοβολία

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι οποιοδήποτε είδος σωματιδίου ή ηλεκτρομαγνητικού κύματος που μεταφέρει αρκετή ενέργεια ώστε να ιονίσει ή να απομακρύνει ηλεκτρόνια από ένα άτομο. Το φάσμα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας φαίνεται στην **Εικόνα Θ3-1**.



Εικόνα Θ3-1: Η εικόνα αυτή απεικονίζει το φάσμα για τη μη ιοντίζουσα και ιοντίζουσα ακτινοβολία. Πηγή: [https://biotech.law.lsu.edu/research/reports/ACHRE/intro\\_9\\_1](https://biotech.law.lsu.edu/research/reports/ACHRE/intro_9_1)

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία περιλαμβάνει το πιο ενεργό άκρο του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (ακτίνες Χ και ακτίνες γάμμα) και υποατομικά σωματίδια, όπως ηλεκτρόνια, νετρόνια, σωματίδια άλφα και σωματίδια βήτα.

Η ακτινοβολία γάμμα (με μήκος κύματος:  $10^{-14}$  έως  $10^{-10}$  μέτρα) παράγεται από πυρηνικές αντιδράσεις, όπως η διάσπαση ραδιενεργών πυρήνων, ή στοιχειωδών σωματιδίων.

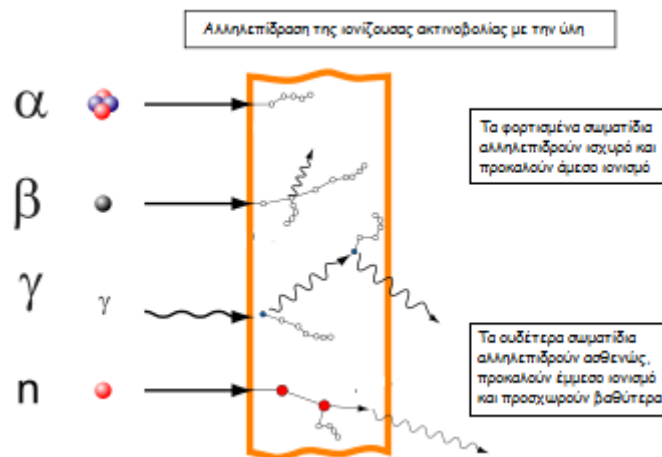
Οι ακτίνες-Χ (με μήκος κύματος:  $10^{-11}$  έως  $10^{-7}$  m) παράγονται έξω από τον πυρήνα, μέσω της επιτάχυνσης ηλεκτρονίων από δυναμικό τάξης μεγέθους των δεκάδων χιλιάδων βολτ και της πρόσπτωσή τους σε στόχο ο οποίος αποτελείται από μεταλλικό υλικό μεγάλου ατομικού αριθμού.

Και οι δύο, οι ακτίνες Χ και οι ακτίνες γάμμα, μπορούν να διεισδύσουν βαθιά στο ανθρώπινο σώμα, σε βάθος το οποίο εξαρτάται από την ενέργεια τους, καθώς η υψηλότερη ενέργεια οδηγεί σε βαθύτερη διείσδυση στο σώμα.

Τα σωματίδια άλφα είναι συστάδες δύο νετρονίων και δύο πρωτονίων το καθένα. Είναι πανομοιότυπα με τους πυρήνες των ατόμων τουηλίου  ${}^4\text{He}^{2+}$ , το δεύτερο ελαφρύτερο και πιο κοινό στοιχείο του σύμπαντος, μετά το υδρογόνο. Σε σύγκριση με άλλες μορφές ακτινοβολίας, είναι πολύ βαριά σωματίδια - περίπου 7.300 φορές τη μάζα ενός ηλεκτρονίου. Τα σωματίδια α αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια των ατόμων και χάνουν γρήγορα την ενέργειά τους. Αν απελευθερωθούν μέσα στο σώμα από ένα ραδιενεργό άτομο, μέσα ή κοντά σε ένα κύτταρο, τα σωματίδια άλφα μπορούν να κάνουν μεγάλες ζημιές καθώς ιονίζουν τα άτομα, διακόπτοντας τα ζωντανά κύτταρα. Το ράδιο και το πλουτώνιο είναι δύο παραδείγματα των εκπομπέων άλφα. [25,26]

Τα σωματίδια βήτα είναι σωματίδια υψηλής ενέργειας, είτε ηλεκτρόνια υψηλής ταχύτητας ή ποζιτρόνια που εκπέμπονται από ορισμένες μορφές ραδιενεργών πυρήνων, όπως το κάλιο-40. Τα ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν βήτα σωματίδια είναι συνήθως προϊόντα σχάσης που παράγονται σε πυρηνικούς αντιδραστήρες και πυρηνικές εκρήξεις. Ορισμένα ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν βήτα, όπως το ιώδιο 131, χορηγούνται εσωτερικά σε ασθενείς για διάγνωση και θεραπεία ασθενειών.[25,26]

Τα νετρόνια που εκπέμπονται κατά τη διάρκεια ορισμένων διαδικασιών πυρηνικής αποσύνθεσης συμπεριλαμβάνονται συχνά στα σωματίδια ιονισμού, αλλά στην πραγματικότητα δεν ιονίζουν άμεσα ένα άτομο. Τα νετρόνια αλληλεπιδρούν με έναν άλλον πυρήνα, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε μια δευτερογενή διαδικασία που περιλαμβάνει ιονίζουσα ακτινοβολία. [1][24]



Εικόνα Θ3-2: Παραδείγματα ιονίζουσας ακτινοβολίας: Η ακτινοβολία α αποτελείται από επιταχυμένους πυρήνες Ηλίου-4 ( ${}^4\text{He}$ ). Η ακτινοβολία β αποτελείται από επιταχυμένα ηλεκτρόνια. Η ακτινοβολία γ είναι πιο διεισδυτική και αποτελείται από φωτόνια υψηλής ενέργειας. Η ακτινοβολία νετρονίων αποτελείται από ελεύθερα νετρόνια. Πηγή: Τροποποιημένη από Wikimedia Commons

## 3.2 Αλληλεπίδραση φωτονίων και ύλης

Οι τρεις τρόποι αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη (βιολογική) ύλη είναι οι εξής [1]:

- Με το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο (Photoelectric Effect)
- Με τη σκέδαση Compton (Compton Scattering)
- Με τη δίδυμη γένεση (Pair Production)

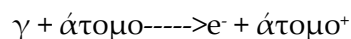
Και στις τρεις παραπάνω διαδικασίες έχουμε εκπομπή ηλεκτρονίων.

### 3.2.1 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

Κατά το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, απελευθερώνονται ηλεκτρόνια από μια επιφάνεια αγωγού, όταν σε αυτήν την επιφάνεια προσπέσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας τέτοιας ώστε τα ηλεκτρόνια να κατορθώσουν να υπερπηδήσουν το φράγμα δυναμικής ενέργειας που τα "εγκλωβίζει" στην επιφάνεια αυτή.

Όταν η ενέργεια φωτονίου ( $h\nu$ ) είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης ή τη συνάρτηση έργου ηλεκτρονίου ( $\Phi$ ), τότε εκπέμπεται ένα ατομικό ηλεκτρόνιο με κινητική

ενέργεια ( $T$ ):  $T = h\nu - \Phi$ . Το εισερχόμενο φωτόνιο έχει ενέργεια  $E_\gamma$  η οποία απορροφάται εξ' ολοκλήρου και αποδεσμεύει ένα ατομικό  $e$



Το παραγόμενο φωτοηλεκτρόνιο έχει κινητική ενέργεια  $K = E_\gamma - \Phi$ , όπου  $\Phi$  είναι η ενέργεια σύνδεσης. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να ισχύει η ανισότητα  $E_\gamma \geq \Phi$ . Το κενό που δημιουργείται μετά την εκπομπή του φωτοηλεκτρονίου ( $j$ ) καλύπτεται από ένα άλλο ηλεκτρόνιο ( $i$ ) που προέρχεται από κάποιο ανώτερο ατομικό φλοιό ενέργειας σύνδεσης  $\Phi_i < \Phi_j$  οδηγώντας σε δυο εναλλασσόμενους μηχανισμούς:

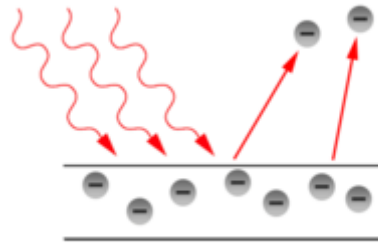
#### A) Φθορισμό ακτινών-X

Κατά το φθορισμό των ακτινών-X παράγονται δευτερεύουσες ακτίνες-X ενέργειας  $\Phi_j - \Phi_i$  και το φορτίο του εναπομείναντος ιόντος παραμένει αμετάβλητο.

#### B) Φαινόμενο Auger

Το φωτόνιο που έχει εκπεμφθεί από την αντικατάσταση του κενού που είχε δημιουργηθεί από το φωτοηλεκτρονικό φαινόμενο μπορεί να απορροφηθεί από κάποιο άλλο ηλεκτρόνιο του ίδιου ατόμου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου φωτοηλεκτρονίου αφήνοντας ένα νέο κενό. Το νέο αυτό φωτοηλεκτρόνιο ονομάζεται

ηλεκτρόνιο Auger. Το αρχικό κενό αντικαθίσταται από δύο κενά. Τα νέα κενά καλύπτονται από μεταπτώσεις ηλεκτρονίων από μεγαλύτερους φλοιούς μέχρι το ιονισμένο άτομο βρεθεί στην κατάσταση όπου δεν μπορούν να συμβούν άλλες μεταπτώσεις.



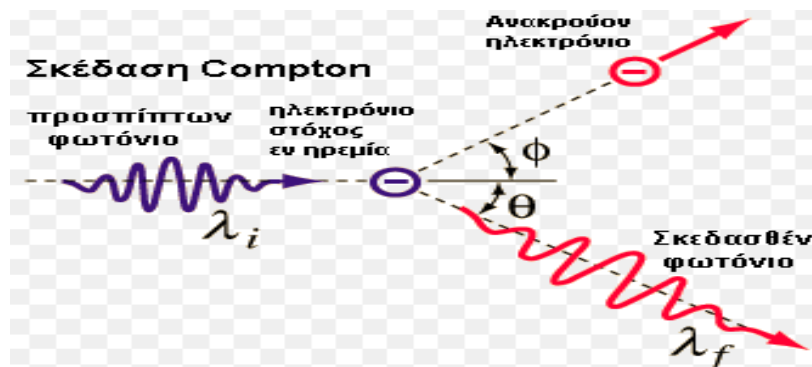
Εικόνα Θ3-3: Απεικόνιση του Φωτοηλεκτρικού Φαινομένου

### 3.2.2 Σκέδαση Compton

Στη σκέδαση Compton ένα φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα ηλεκτρόνιο μέσα στο υλικό απορρόφησης. Κατά αυτήν την διαδικασία η κινητική ενέργεια του ηλεκτρονίου αυξάνεται και μεταβάλλεται η διεύθυνση και η ενέργεια του φωτονίου. Το φωτόνιο μεταφέρει μέρος της ενέργειάς του στο ηλεκτρόνιο το οποίο μετά τη σκέδαση ονομάζεται «ανακλώμενο ηλεκτρόνιο». Η ενέργεια του σκεδαζόμενου φωτονίου μετά από αυτήν την αλληλεπίδραση δίνεται από την παρακάτω εξίσωση :

$$E'_\gamma = \frac{E_\gamma}{1 + \frac{E_\gamma}{mc^2}} (1 - \cos\theta) \quad ,$$

όπου  $E_\gamma$  είναι η ενέργεια του αρχικού φωτονίου,  $E'_\gamma$  η ενέργεια του σκεδασμένου φωτονίου,  $mc^2$  είναι η μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου και  $\theta$  είναι η γωνία σκέδασης. Από την εξίσωση αυτή συνεπάγεται ότι αρκετά σημαντικές παρεκτροπές μπορεί να συμβούν με πολύ μικρή απώλεια ενέργειας.



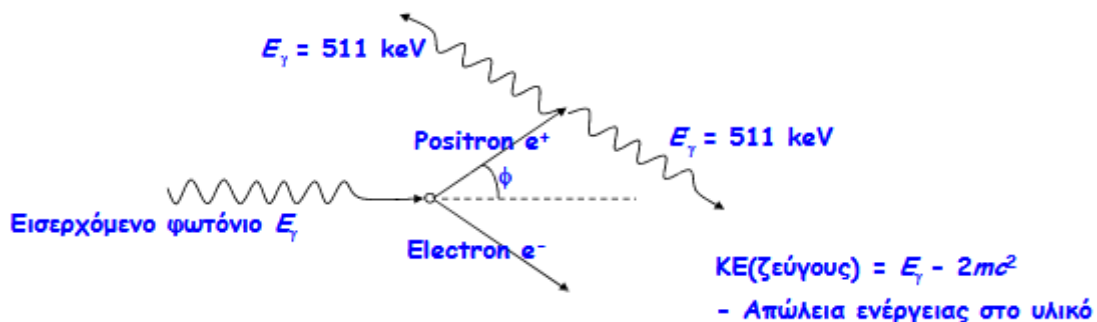
Εικόνα Θ3-4: Απεικόνιση της Σκέδασης Compton

Η πιθανότητα να συμβεί το Compton είναι ανεξάρτητη του ατομικού αριθμού του υλικού.

### 3.2.3 Δίδυμη Γένεση

Η δίδυμη γένεση είναι το φαινόμενο της παραγωγής ενός ζεύγους ενός σωματιδίου και του αντισωματιδίου του. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όταν ένα φωτόνιο υψηλής ενέργειας (π.χ. ακτίνες γάμμα) ή ένα άλλο ουδέτερο μποζόνιοδιέρχεται μέσα από ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, όπως το ηλεκτρικό πεδίο που σχηματίζεται κοντά στον πυρήνα ενός ατόμου.

Για να γίνει η παραγωγή του ζεύγους (π.χ. ηλεκτρόνιο και ποζιτρόνιο) απαιτείται μία ελάχιστη ενέργεια  $E_\gamma \geq 2m_e c^2 + \frac{2m_e^2 c^2}{m_{nucleus}}$ . Το ποζιτρόνιο χάνοντας την ενέργεια του, έλκει ένα ηλεκτρόνιο και εξαυλώνεται σε δύο φωτόνια που το καθένα έχει ενέργεια 0,511MeV.



Εικόνα Θ3-5:Απεικόνιση της Δίδυμης Γένεσης

## 3.3 Μέτρηση της ποσότητας της ακτινοβολίας

Καθώς η ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη επιφέρει ιονισμό ή διέγερση των ατόμων και των μορίων. Οι μονάδες δοσιμετρίας αποτελούν μέτρηση της ποσότητας ιονισμού που προκαλείται, ή του ποσού της ενέργειας που έχει εναποτεθεί στην ύλη.

### 3.3.1 Απορροφημένη δόση (D)

Απορροφημένη δόση είναι ο ιονισμός ανά μονάδα χρόνου ή ρυθμός έκθεσης που οφείλεται σε μία πηγή. Ορίζεται ως η ενέργεια που αποθέτει η προσπίπτουσα

ακτινοβολία κατά τη διέλευση της στη μονάδα μάζας των ιστών ανά μονάδα μάζας με τύπο:

$$D = \frac{\Delta E_{dep}}{\Delta M}$$

Μονάδα μέτρησης της απορροφημένης δόσης είναι το 1 Gray (Gy) = 1J/Kg=100rad (radiationabsorbeddose)

### 3.3.2 Ισοδύναμη Δόση( H<sub>T</sub>)

Η βιολογική επίπτωση εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας, καθώς η επίδραση σχετίζεται με την εναπόθεση της ενέργειας σε μικροσκοπικό επίπεδο. Η ισοδύναμη δόση σε κάποιο όργανο/ιστό (T) ορίζεται ως η απορροφημένη δόση από το όργανο/ιστό πολλαπλασιασμένη με έναν συντελεστή στάθμισης, w<sub>R</sub>, **Πίνακας Θ3-1**, με τύπο

$$H_T = w_R \cdot D_T$$

Μονάδα μέτρησης της ισοδύναμης δόσης είναι το 1 Rem ( Roentgen equivalent mass) = w<sub>R</sub>· 1 rad και στο S.I το 1 Sievert (1 Sv)=1Gy· w<sub>R</sub>[27,28].

Στον **Πίνακα Θ3-1** δίνονται για τα διάφορα είδη ακτινοβολίας οι συντελεστές στάθμισης w<sub>R</sub>.

Είδος ακτινοβολίας	Συντελεστής στάθμισης ακτινοβολίας w <sub>R</sub>
Φωτόνια (x και γ) όλων των ενεργειών	1
Ηλεκτρόνια	1
Πρωτόνια	2
Σωματία α, θραύσματα σχάσης, βαρεά ιόντα	20
Νετρόνια	5-20 ανάλογα την ενέργεια

*Πίνακας Θ3-1: Συντελεστές στάθμισης της ακτινοβολίας w<sub>R</sub>για τον υπολογισμό της ισοδύναμης δόσης.*

### 3.3.3 Ενεργός δόση (E<sub>eff</sub>)

Η ποσότητα «ενεργός δόση» ορίστηκε για να μπορεί να εκτιμηθεί η συνολική επιβάρυνση της υγείας από την ακτινοβολήση ενός οργάνου ή ιστού.

Ορίζεται ως το γινόμενο της ισοδύναμης δόσης ( $H_T$ ) έλαβε ένα όργανο/ιστός επί έναν συντελεστή  $w_T$  που εξαρτάται από το όργανο/ιστό, Πίνακας Θ3-2, με τύπο [27,28]

$$E_{\text{eff}} = w_T H_T, \text{ ή } E_{\text{eff}} = D_{WR} w_T$$

Μονάδα μέτρησης της ενεργού δόσης είναι το 1 Sievert (Sv)

Ιστός ή Όργανο	$w_T$
Γεννητικοί αδένες	0,2
Μυελός οστών, Κόλον, Πνεύμονας, καρδιά, έντερο, μαστός, κύστη	0,12
Γονάδες	0,08
Ουροδόχος κύστη, οισοφάγος, ήπαρ, Θυρεοειδής	0,05
Επιφάνεια οστών, εγκέφαλος, σιελογόνοι αδένες, δέρμα	0,01

Πίνακας Θ3-2 : Συντελεστές στάθμισης των εκτιθέμενων ιστών  $w_T$  για τον υπολογισμό της ενεργού δόσης  $E_{\text{eff}}$ .

### 3.3.4 Έκθεση

Έκθεση είναι η διαδικασία μεταφοράς ενέργειας, με τη μορφή σωματιδίων ή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων ικανών να παράγουν άμεσα ή έμμεσα ιόντα στον άνθρωπο που εκτίθεται σε ιονίζουσες ακτινοβολίες. Ορίζεται ως το άθροισμα όλων των ηλεκτρικών φορτίων ( $\Delta Q$ ) όλων των ιόντων του ίδιου προσήμου, που έχουν παραχθεί μέσα σε ένα στοιχειώδη όγκο αέρα μάζας  $\Delta m$ , με τύπο  $X = \Delta Q / \Delta m$  και ορίζεται μόνο για ακτινοβολίες  $X$  και  $\gamma$  στον αέρα, ενέργειας  $< 2\text{MeV}$ .

Μονάδα μέτρησης της έκθεσης είναι το 1 C/ Kg στο S.I ή το 1R (roentgen) =  $2,58 \times 10^{-4} \text{C/Kg}$

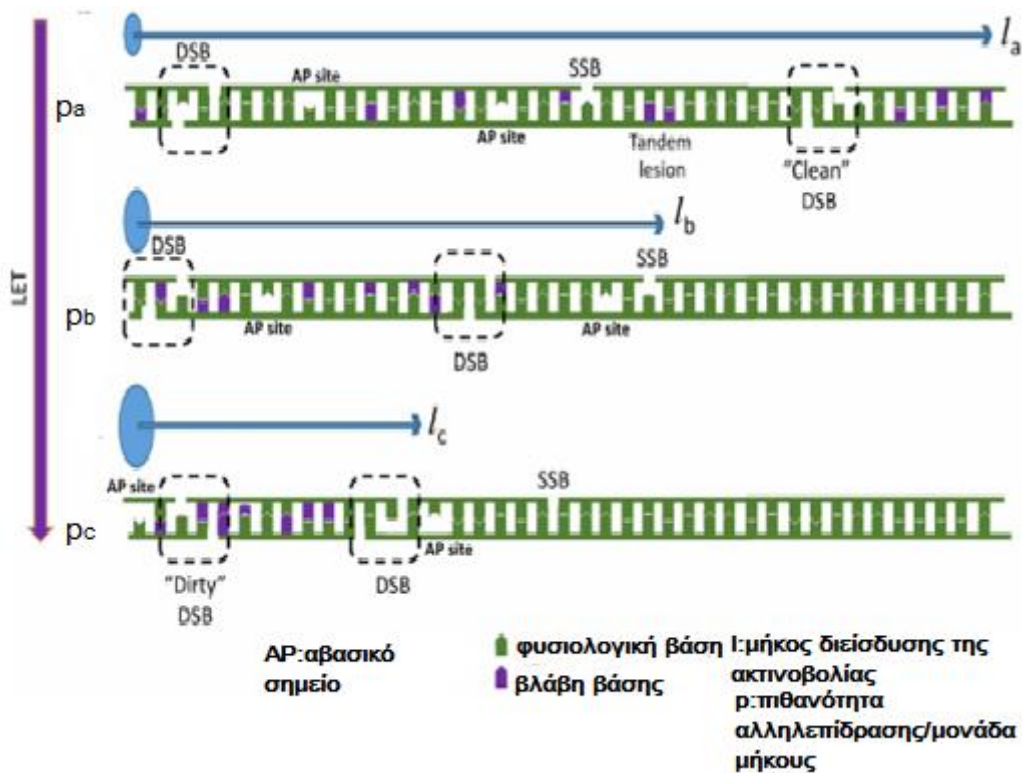
Η μονάδα 1 Roentgen εκφράζει την ποσότητα των ακτινών- $X$  που προκαλεί ιονισμό 1 esu/cm<sup>3</sup> στον αέρα.

### 3.3.5 LET (Linear Energy Transfer) / Γραμμική Εναπόθεση Ενέργειας

Κατά τη δοσιμετρία, η LET είναι μια φυσική ποσότητα που αντιπροσωπεύει την μέση ενέργεια που εναποτίθεται ανά μονάδα μήκους της τροχιάς φορτισμένων σωματιδίων και διακρίνεται σε υψηλή και χαμηλή LET. Τα σωματίδια αυτά απελευθερώνονται από ραδιενεργή διάσπαση ή / και από αλληλεπιδράσεις ακτινοβολίας σε ένα δεδομένο υλικό. Περιγράφει δηλαδή τη δράση της ακτινοβολίας στο υλικό. Εξ' ορισμού η LET είναι θετική ποσότητα και εξαρτάται από τη φύση της ακτινοβολίας και το υλικό που



διασχίζει. Ακτινοβολίες χαμηλής LET, εξαιτίας του γεγονότος ότι δίνουν μικρότερη πιθανότητα ιονισμού μέσα στις ευαίσθητες θέσεις του κυττάρου, έχουν λιγότερα πλήγματα. Σε αυτές τις ακτινοβολίες ανήκουν τα φωτόνια, τα σωματία  $\alpha$  και  $\beta$  και τα πρωτόνια. Ακτινοβολίες υψηλής LET θα εξασθενίσουν γρηγορότερα και θα τους αποτραπεί η βαθιά διείσδυση στο μέσον που διασχίζουν. Από την άλλη πλευρά, η υψηλότερη συγκέντρωση της εναποτιθέμενης ενέργειας μπορεί να προκαλέσει σοβαρότερη βλάβη στις βιολογικές δομές κοντά στην τροχιά σωματιδίων[29], διότι οι πυκνές βλάβες δυσκολεύουν το κύτταρο ώστε να ανταποκριθεί κατάλληλα. Σε αυτές τις ακτινοβολίες ανήκουν τα νετρόνια, τα  $\pi$ - μεσόνια και τα βαρεά ιόντα. Η μονάδα στο SI της LET εκφράζεται σε  $[\text{keV} / \mu\text{m}]$  ή  $[\text{MeV} / \text{cm}]$ . Στην **Εικόνα Θ3-6**, παρατίθεται ένα παράδειγμα μίας διάστασης, που δείχνει πως όσο αυξάνεται η LET για δεδομένη ενέργεια, οι βλάβες γίνονται πυκνότερες.



Εικόνα Θ3-6: Συσχέτιση βλαβών και και ακτινοβολίας LET. Εμφανίζονται τρία διαφορετικά σωματίια ίδιας ενέργειας αλλά διαφορετικής LET, τα οποία αλληλεπιδρούν με ένα μόριο DNA. Υποθέτοντας ότι  $LET_a < LET_b < LET_c$ , ισχύει ότι  $p_a < p_b < p_c$ , όπου  $p$  η πιθανότητα αλληλεπίδρασης ανά μονάδα μήκους και επομένως  $l_a > l_b > l_c$ , όπου  $l$  το μήκος διείσδυσης της ακτινοβολίας. Το σωματίιο με τη μικρότερη LET διανύει την μεγαλύτερη απόσταση, ενώ εκείνο με τη μεγαλύτερη LET, διανύει τη μικρότερη απόσταση προκαλώντας πυκνότερες βλάβες, αφού και τα τρία σωματίια έχουν την ίδια ενέργεια και μπορούν να προκαλέσουν τον ίδιο αριθμό βλαβών. Πηγή: Τροποποίηση από Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG and Ravanat J-L (2015) Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front. Chem.* 3:35

## 3.4 Ιοντίζουσα Ακτινοβολία και Βιολογικές Επιπτώσεις

Μέσω της μετατόπισης των ηλεκτρονίων (ιονισμού), η ιοντίζουσα ακτινοβολία διαταράσσει σημαντικά τους μοριακούς δεσμούς. Σε ζωντανούς οργανισμούς, η διαταραχή αυτή μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη στα κύτταρα και στο γενετικό τους υλικό. Ο χαρακτηριστικός τύπος βλάβης του DNA που επάγεται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, ακόμη και με μία μοναδική διαδρομή ακτινοβολίας διαμέσου ενός κυττάρου, είναι οι αποκαλούμενες «σύνθετες βλάβες DNA» (complex DNA damage) ή οι «ομαδοποιημένες βλάβες DNA» (clustered DNA damage). Οι συστάδες αυτές των βλαβών DNA θέτουν σε κίνδυνο τη διατήρηση της ακεραιότητας του κυττάρου, καθώς συχνά οι κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA αδυνατούν να τις αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά. Ορισμένα κύτταρα είναι δυνατόν να διαφύγουν από αυτές τις οδούς επιδιόρθωσης βλαβών, να πολλαπλασιαστούν και τελικά να υποστούν κακοήγη μετασχηματισμό, ένα κρίσιμο βήμα στην ανάπτυξη του καρκίνου.

### 3.4.1 Η LET και η Σχετική Βιολογική Αποτελεσματικότητα (RBE)

Η Σχετική Βιολογική Αποτελεσματικότητα (Relative Biological Effectiveness) είναι το πηλίκο της δόσης της εξεταζόμενης ακτινοβολίας που προκαλεί ένα συγκεκριμένο βιολογικό αποτέλεσμα, προς τη δόση ακτίνων X ενέργειας 220KeV που προκαλεί το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα. Η σχέση εξαρτάται από το βιολογικό υλικό στο οποίο αναφερόμαστε. Ακόμη και αν αυτά είναι σταθερά, διαφορετικά φάσματα ακτινοβολίας που μοιράζονται την ίδια LET έχουν σημαντικά διαφορετική RBE. [30]

Η ακτινοβολία αναφοράς που χρησιμοποιείται τυπικά κατά την αξιολόγηση της RBE είναι η ακτινοβολία ακτίνων X ή ακτινοβολίας ακτίνων γάμμα χαμηλής-LET για την οποία η RBE ορίζεται ως 1,0. Όταν αξιολογούνται ορισμένα βιολογικά αποτελέσματα της ακτινοβολίας υψηλής LET (όπως τα ταχεία νετρόνια) σε ανθρώπινα κύτταρα, η RBE μπορεί να ποικίλει ευρέως, κυμαινόμενη από περίπου 3 έως μεγαλύτερη από 100 για μια ποικιλία επιδράσεων. Η LET έχει περιορισμένη χρήση στην πρόβλεψη της έκτασης της βιολογικής επίδρασης επειδή, παρόλο που παρέχει μια ακριβή ένδειξη της αναμενόμενης απώλειας ενέργειας από ένα σωματίδιο και τη μεταφορά στα ηλεκτρόνια του ιστού, δεν παρέχει ακριβή ένδειξη της πραγματικής ενέργειας που εναποτέθηκε σε μικρό όγκο-στόχο, όπως τα μεμονωμένα κύτταρα.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η LET είναι μια παράμετρος της οποίας το μέγεθος αποδίδει κάποιες πληροφορίες σχετικά με την πιθανή σημασία του RBE, αλλά οι ποσοτικές προβλέψεις των τιμών RBE από τις τιμές LET δεν είναι γενικά δυνατές. [30,31]

### 3.4.2 Άμεση και Έμμεση δράση

Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορούν να προκαλέσουν χημικές μεταβολές στα βιολογικά συστήματα είτε με άμεση είτε με έμμεση δράση.

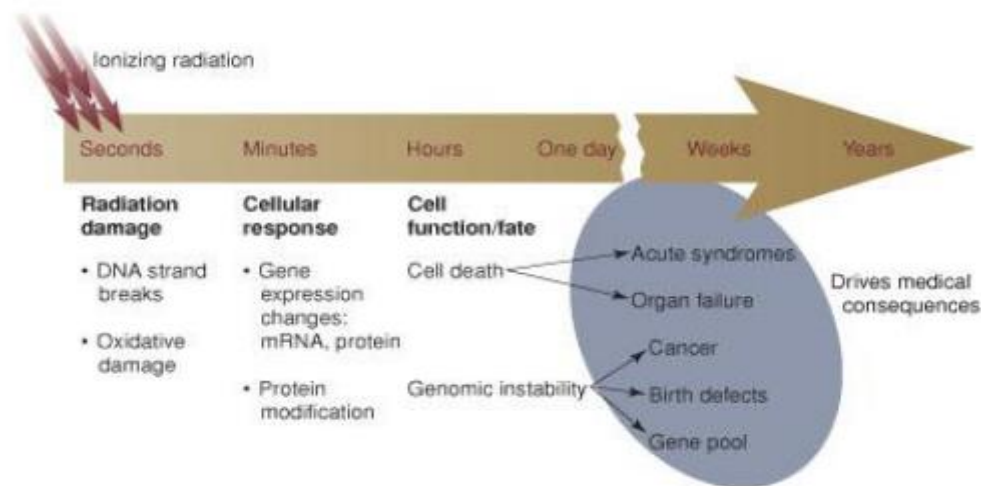
#### 3.4.2.1 Άμεση Δράση

Η άμεση δράση αφορά την απευθείας δράση της ακτινοβολίας στο μόριο του DNA ή σε άλλα μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και το RNA. Παραδείγματος χάριν, αν μία πρωτεΐνη προσβληθεί από το ιόν που θα σχηματιστεί από τη δράση της ακτινοβολίας, τότε πιθανόν οι δεσμοί που τη συγκροτούν θα σπάσουν ή θα αλλάξει σχήμα, καθιστώντας τη μη λειτουργική.

#### 3.4.2.2 Έμμεση Δράση

Στην έμμεση δράση προκαλείται χημική μεταβολή μέσω δευτερογενών αντιδράσεων του βιολογικού μακρομορίου, συνήθως μέσω της επίδρασης διεγερμένων ή ιονισμένων μορίων νερού του κυτταροπλάσματος ή μέσω των ελεύθερων ριζών που προκύπτουν από τη ραδιόλυση του ύδατος[2].

Κατά την έμμεση δράση, η σχέση ανάμεσα στη δόση της ακτινοβολίας και τη χημική μεταβολή εξαρτάται από το προϊόν που προκύπτει από αυτήν την αντίδραση. Αν το προϊόν της αρχικής αντίδρασης των ελεύθερων ριζών και του μακρομορίου δεν μπορεί να αντιδράσει εκ νέου με ελεύθερες ρίζες, τότε ο αριθμός των μεταβαλλόμενων μορίων θα είναι ευθέως ανάλογος της δόσης ακτινοβολίας. Σε περίπτωση όμως που το προϊόν της αρχικής αντίδρασης, όπως πχ ένα αδρανοποιημένο ένζυμο μπορεί να αντιδράσει εκ νέου με ελεύθερες ρίζες, τότε ο αριθμός των μεταβαλλόμενων μορίων αυξάνει εκθετικά με τη δόση της ακτινοβολίας.[32,33]



Εικόνα Θ3-7: Αναπαρίσταται η διαγραμματική απεικόνιση της ανταπόκρισης του ανθρώπινου οργανισμού στην ιοντίζουσα ακτινοβολία από τα πρώτα δευτερόλεπτα μέχρι και χρόνια μετά. Πηγή: <https://str.llnl.gov/str/JulAug03/Wyrobek.html>

### 3.4.3 Επίδραση Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας και Χρόνος

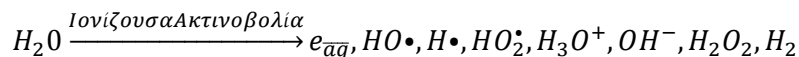
Ο χρόνος μεταξύ της ακτινοβόλησης και της εμφάνισης των βιολογικών αποτελεσμάτων διακρίνονται σε:

1. Φυσικό στάδιο → Τα άτομα του υλικού διεγείρονται ή ιονίζονται και τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν, μεταπηδούν σε τροχιές υψηλότερης ενέργειας. Κατά τον ιονισμό ηλεκτρόνια εκτινάσσονται από το άτομο (δευτερεύοντα ηλεκτρόνια).
2. Φυσικοχημικό στάδιο → Τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια προκαλούν ιονισμούς κατά την πορεία τους, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών ( $H\bullet$  και  $OH\bullet$ ) και διεγερμένων μορίων.
3. Χημικό στάδιο → Οι ρίζες  $H$  και  $OH$  μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους, με τα παράγωγα τους, με μόρια οργανικών ενώσεων καθώς και με το  $O_2$ .
4. Βιολογικό στάδιο → Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβη σε κυτταρικούς στόχους όπως το DNA, το RNA, τα ένζυμα και η μεμβράνη.

### 3.4.4 Η ραδιόλυση του ύδατος

Η ραδιόλυση του νερού είναι η διάσπαση των δεσμών του μορίου του που οφείλεται στην ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Η ραδιόλυση του νερού μπορεί να γραφεί ως:



Το  $HO_2\bullet$  είναι ένα δευτερεύον και αμελητέο είδος στην περίπτωση της ακτινοβολίας χαμηλής LET.

Συνήθως, αυτή η ιοντίζουσα ακτινοβολία προέρχεται από τη διάσπαση ραδιενεργών πυρήνων, δέσμες επιταχυνόμενων φορτισμένων σωματιδίων και από ακτινοβολία ακτίνων Χ (με ενέργεια φωτονίου μεγαλύτερη από 50-100 eV).

Τα στάδια που ακολουθεί η ραδιόλυση του ύδατος συνοπτικά είναι τα εξής: [34,35,36], όπως φαίνονται στην **Εικόνα Θ3-8** [36].

1. Το φυσικό στάδιο, το οποίο επιτυγχάνεται περίπου 1 fs μετά την αρχική αλληλεπίδραση ύλης- ιοντίζουσας ακτινοβολίας, συνίσταται στην εναπόθεση ενέργειας ακολουθούμενη από διαδικασίες γρήγορης χαλάρωσης. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό μορίων ιονισμένου νερού ( $H_2O^+$ ), διεγερμένων μορίων νερού ( $H_2O^*$ ) και υπο-διεγερμένων ηλεκτρονίων ( $e^-$ ).

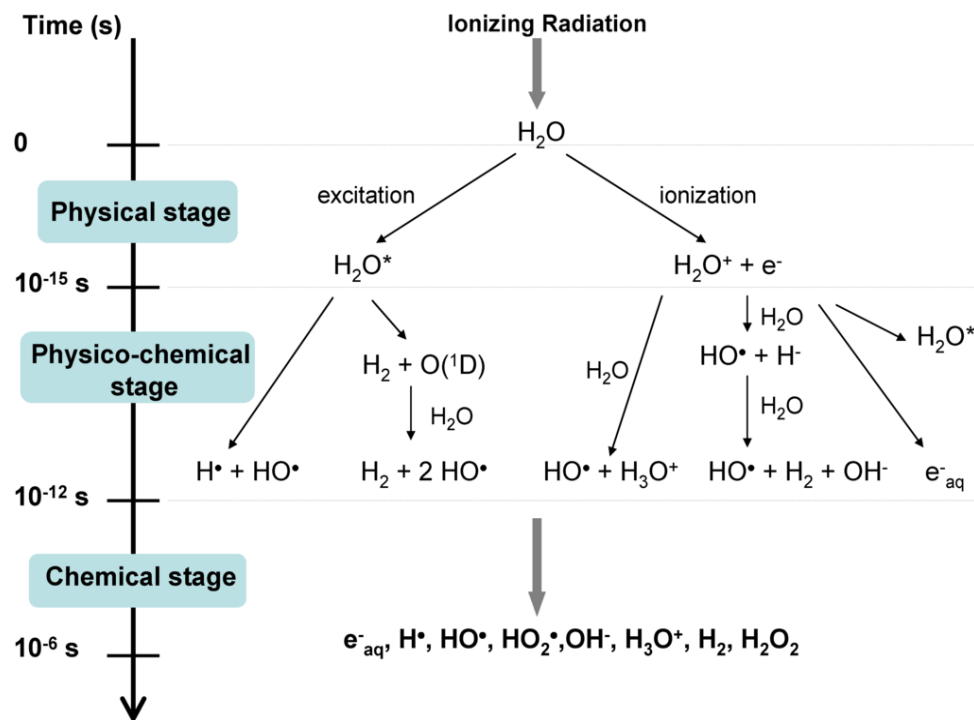
2. Κατά τη διάρκεια του φυσικοχημικού σταδίου ( $10^{-15}$ - $10^{-12}$  s), συμβαίνουν πολυάριθμες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της αντίδρασης των ιόντων-μορίων (2), της αποσυνδεδετικής χαλάρωσης (3), του αυτο-ιονισμού των διεγερμένων καταστάσεων, της θερμικής επεξεργασίας των υπο-διεγερμένων ηλεκτρονίων (4) και τη διάχυση οπών.



3. Κατά τη διάρκεια του χημικού σταδίου ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  s), τα είδη αντιδρούν κατά την πορεία τους και στη συνέχεια διαχέονται στο διάλυμα. Μπορούν έτσι να αντιδρούν μεταξύ τους αλλά και με τα περιβάλλοντα μόρια (στη διαλυμένη ουσία). Η τροχιά των

σωματιδίων επεκτείνεται λόγω της διάχυσης των ριζών και των συνεχών χημικών αντιδράσεων τους.

Οι σχηματιζόμενες ρίζες είναι εξαιρετικά ασταθείς και αντιδρούν με τα βιολογικά μακρομόρια που βρίσκονται διαλυμένα στην υδατική φάση προκαλώντας χημικές μεταβολές και αλλοιώσεις.



Εικόνα Θ3-8: Σχηματική Αναπαράσταση της ραδιόλυσης του νερού συναρτήσει του χρόνου και του φυσικού, φυσικοχημικού και χημικού σταδίου μετά την εναπόθεση της ενέργειας λόγω της ακτινοβολίας στα μόρια του νερού. Πηγή: *Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation* (2011)

### 3.5 Γενικά για τις βλάβες DNA

Οι επιπτώσεις που έχει η ακτινοβολία στο DNA μπορούν να διακριθούν σε στοχευμένες και μη στοχευμένες. Οι στοχευμένες επιπτώσεις αναφέρονται στην άμεση και απ' ευθείας έκθεση κυττάρων στην ακτινοβολία. Οι μη στοχευμένες αναφέρονται στην έμμεση έκθεση μέσω διαφόρων παραγόντων που παράγονται/εκλύονται από τα κύτταρα [37].

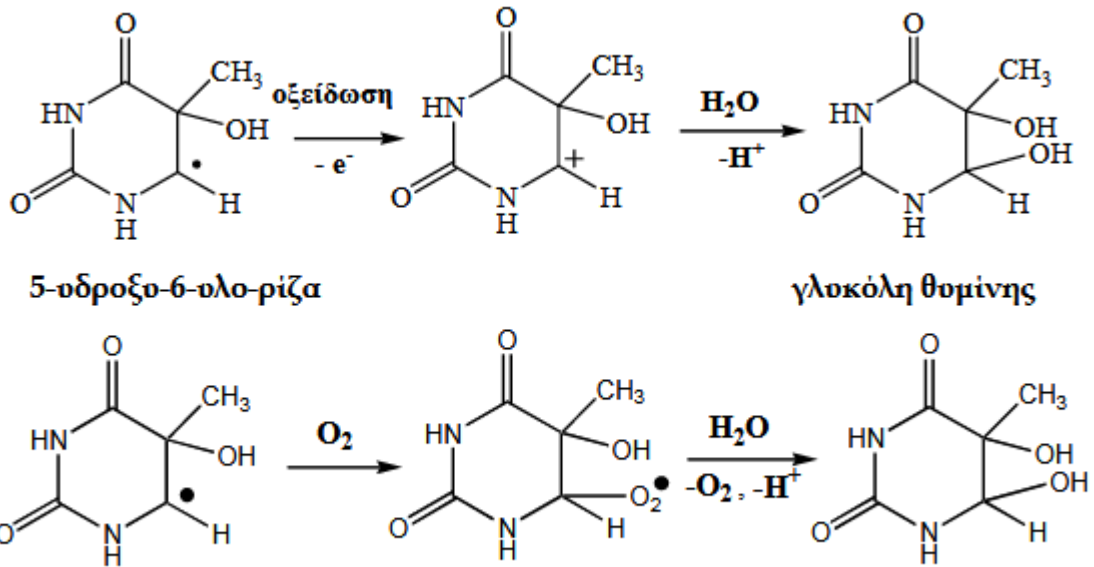
Στην πρώτη περίπτωση, η πιο ευπαθής βάση είναι η γουανίνη, αφού έχει τη μικρότερη ενέργεια ιονισμού. Ακόμη κι αν η οξειδωση λάβει χώρα αρχικά σε άλλο τμήμα του

DNA, μέσω μιας ταχείας αντίδρασης μεταφοράς ηλεκτρονίου, το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στη γουανίνη, η οποία σχηματίζει ρίζα [20]. Η ρίζα αυτή μπορεί με τη σειρά της να αποσυντεθεί είτε μέσω αποπρωτονίωσης ή ενυδάτωσης, δημιουργώντας την 8-oxodGuo.

Στην περίπτωση της έμμεσης αλληλεπίδρασης, πρωταγωνιστικό ρόλο έχουν οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Η αντίδραση των HO• με το DNA περιλαμβάνει είτε προσθήκη σε αρωματικά τμήματα των βάσεων ή απόσπαση υδρογόνου. Έχει υπολογιστεί πως περίπου το 70% των ριζών υδροξυλίου αντιδρά με τις αζωτούχες βάσεις ενώ ένα 30% στοχεύει τα σάκχαρα του σκελετού του DNA προκαλώντας θραύσεις.

Το χαρακτηριστικό της αλληλεπίδρασης της ιοντιζουσας ακτινοβολίας είναι πως προκαλεί πολλαπλές βλάβες σε μια εκτενή περιοχή του DNA. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις πως το DNA αποτελεί τον κύριο στόχο των ιονιζουσών ακτινοβολιών [4,5], κυρίως λόγω της μεγάλης του έκτασης και της πληθώρας από χημικές ομάδες που διαθέτει (αζωτούχες βάσεις, σάκχαρα, φωσφορικές ομάδες). Η επίδραση της ακτινοβολίας μπορεί να προσβάλλει είτε τις βάσεις είτε το σάκχαρο και να εκτείνεται στον ένα ή και στους δύο κλώνους της διπλής έλικας. Κύρια υπεύθυνες γι' αυτές τις βλάβες στο γενετικό υλικό είναι οι ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες προστίθενται στους διπλούς δεσμούς [6] και προκαλούν νέες ρίζες οι οποίες είτε διμερίζονται, είτε αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν υπεροξειδία. Για παράδειγμα, η οξειδωση της 5-υδροξυ-6-υλο-ρίζας της θυμίνης συνοδεύεται με την προσθήκη HO• που οδηγεί στο σχηματισμό της θυμινικής γλυκόλης. Παρουσία οξυγόνου, σχηματίζεται αρχικά η 5-υδροξυ-6-υπεροξυλο-ρίζα και με απώλεια O<sub>2</sub><sup>-</sup> παράγεται ξανά γλυκόλη της θυμίνης.

**Εικόνα 03-9.**



Εικόνα Θ3-9: Σχηματισμός της γλοκόλης θυμίνης από την οξείδωση της 5-υδροξυ-6-υλο-ριζας της θυμίνης. Παρουσία οξυγόνου σχηματίζεται η 5-υδροξυ-6-υπεροξυλο-ριζα και με απόσπασή του σχηματίζεται ξανά η γλοκόλη της θυμίνης. Πηγή: Teoule R, Cadet J. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances-final products. In: Huttermann J, Kohnlein W, Teoule R, Bertinchamps AJ, eds. Effects of Ionizing Radiation on DNA. Springer, New York, 1978:171-203.

Οι πιθανές βλάβες είναι οι εξής:

1. Μονόκλωνη Θραύση της αλυσίδας ( Single Strand Break-SSB)

Από τους διάφορους τύπους βλάβης του DNA που συμβαίνουν στα κύτταρα, η πιο κοινή είναι η θραύση ενός κλώνου (SSB), με συχνότητα δεκάδων χιλιάδων ανά κύτταρο ανά ημέρα από άμεση επίθεση από ενδοκυτταρικούς μεταβολίτες και από ξαφνικές διασπάσεις του DNA [38]. Το σπάσιμο αυτό δημιουργείται όταν υπάρξει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της δεσοξυριβόζης και της φωσφορικής ομάδας του κλώνου του DNA.

2. Δίκλωνη θραύση της αλυσίδας (Double Strand Break-DSB)

Η πιο συχνά παρατηρούμενη βλάβη από ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι η δίκλωνη θραύση, η οποία αποτελείται από δύο μονόκλωνες θραύσεις στους δύο κλώνους του μορίου [15]. Στο σημείο όπου λαμβάνει χώρα η δίκλωνη θραύση ενδέχεται να υπάρξει απώλεια μιας ή περισσότερων βάσεων σε κάθε κλώνο του DNA. Αν η θραύση κάθε



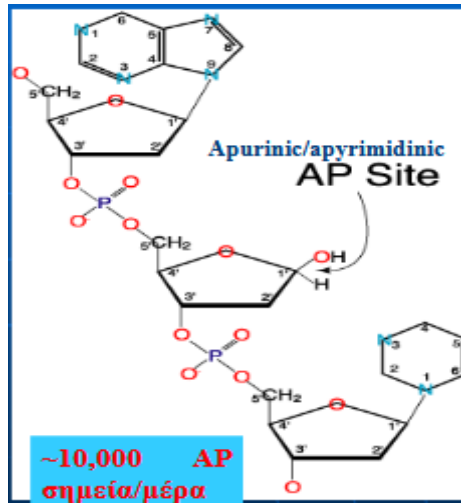
κλώνου είναι ακριβώς απέναντι από την άλλη, τότε έχουμε απώλεια πληροφορίας ενός ζεύγους βάσεων από το γονίδιο που κωδικοποιείται σε αυτό το σημείο του DNA και σε περίπτωση αδυναμίας επιδιόρθωσης μπορεί να υπάρξει μετάλλαξη μετατόπισης πλαϊσίου<sup>11</sup>. Σε περίπτωση που οι θραύσεις είναι μετατοπισμένες στους δύο κλώνους, είναι πιο πιθανή η ακριβής επιδιόρθωση και δεν χάνεται η πληροφορία του γονιδίου. Η επιδιόρθωση όμως απαιτεί την προσθήκη ενός μικρού αριθμού (συνήθως 1-3 έπειτα από βλάβη από ιοντίζουσα ακτινοβολία) δεσοξυριβονουκλεοτιδίων στο τμήμα που έχει υποστεί θραύση. Σε περίπτωση που αυτή η προσθήκη μετατοπίσει τη σύνθεση πέραν του σημείου από όπου έχει χαθεί μία βάση στον αντίθετο κλώνο, θα υπάρξει πάλι απώλεια πληροφορίας. Μόνο αν οι θραύσεις είναι αρκετά μακριά μπορούν να αντιμετωπιστούν ως μονόκλωνες θραύσεις και να επιδιορθωθούν ευκολότερα [19]. Παράλληλα, ενώ οι βλάβες που αφορούν μόνο τον ένα κλώνο δεν είναι τόσο βιολογικά σημαντικές, οι δίκλωνες βλάβες δημιουργούν σημαντικότερο πρόβλημα διότι δεν υπάρχει πάντα ένα υγιές και άθικτο εκμαγείο- πρότυπο, πάνω στο οποίο θα μπορούσε να στηριχτεί η αντιγραφή προς επιδιόρθωση.

### 3. Απώλεια μιας βάσης και δημιουργία αβασικού σημείου, αποπουρινώσεις και αποπυριμιδινώσεις (AP sites)

Απώλεια βάσης σε μία περιοχή μπορεί να συμβεί όταν ο δεσμός μεταξύ δεοξυριβόζης και αζωτούχας βάσης διαταραχτεί, με αποτέλεσμα η αζωτούχα βάση να αποδεσμευτεί από το νουκλεοτίδιο. Αυτή η περιοχή δηλαδή που δε θα υπάρχει βάση, λέγεται αβασική περιοχή ή αποπουρινική/απυριμιδινική.

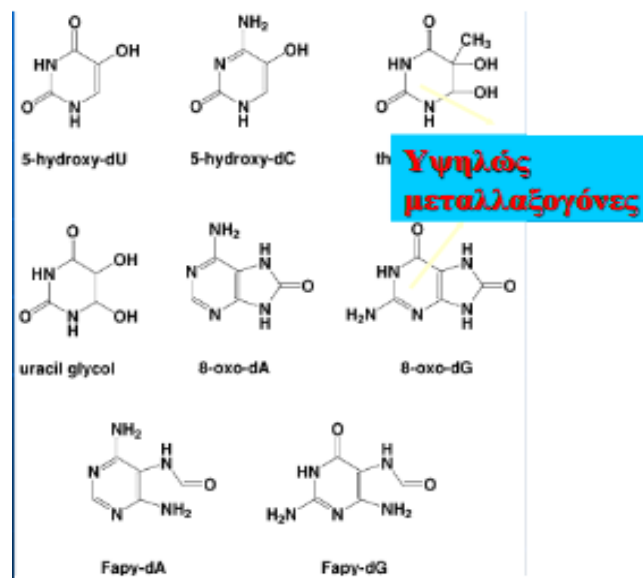
---

<sup>11</sup>Η μετάφραση γίνεται ανά ομάδες τριών νουκλεοτιδίων. Αν προστεθούν ή αφαιρεθούν ένα ή δύο νουκλεοτίδια, αλλάζουν αυτές οι ομάδες (μετατοπίζεται το πλαίσιο ανάγνωσης). Ημετάλλαξη αυτή λοιπόν αναφέρεται στην προσθήκη ή έλλειψη μερικών ή πολλών ζευγών βάσεων.



Εικόνα Θ3-10: Απουρινική/απυριμιδινική περιοχή. Πηγή :Παρουσίαση του Α.Γεωργακίλα(Τομέας Φυσικής Ε.Μ.Π με θέμα «Συσχετισμός μηχανισμών επαγωγής βλαβών DNA, απόκρισης με καρκινογένεση. Πειραματική και βιοπληροφορική ανάλυση.»

4. Σπάσιμο δεσμού υδρογόνου μεταξύ των δύο αλυσίδων.
5. Αλλοίωση μιας βάσης (οξειδώσεις, μεθυλώσεις, απαμινώσεις, αλκυλιώσεις)



Εικόνα Θ3-11: Αλλοιώσεις βάσεων. Πηγή: Παρουσίαση του Γ.Γεωργακίλα(Τομέας Φυσικής Ε.Μ.Π με θέμα «Συσχετισμός μηχανισμών επαγωγής βλαβών DNA, απόκρισης με καρκινογένεση. Πειραματική και βιοπληροφορική ανάλυση.»

## 6. Εγκάρσιες διασυνδέσεις μεταξύ των ελικών (διαδεσμοί- crosslinks)

Μεταξύ αζωτούχων βάσεων στον ίδιο κλώνο του DNA μπορεί να σχηματιστεί ομοιοπολικός δεσμός. Οι βάσεις αυτές μπορεί να έχουν ανάμεσα τους κάποια αζωτούχα βάση ή να είναι γειτονικές.

### 3.6 Ομαδοποιημένες βλάβες

Η σύλληψη των ομαδοποιημένων βλαβών προέκυψε από τους Ward et al. [7,8], ως τοπικώς εντοπισμένες πολλαπλές βλάβες (locally multiple damaged sites-LMDS). Ο Ward εισήγαγε τον όρο ομαδοποιημένες βλάβες για να ερμηνεύσει την αυξημένη θνησιμότητα που προκαλείται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο από την ποσότητα των δίκλωνων θραύσεων που προκύπτουν. Εκτός από τις βλάβες που προκύπτουν άμεσα (αυτές που επιδρούν κατευθείαν πάνω στο μόριο παράγοντας αλλοιώσεις) ή έμμεσα (αυτές που επιδρούν στο περιβάλλον του μορίου), μπορεί να προκύψουν και επιπλέον βλάβες κατά την προσπάθεια επιδιόρθωσης κάποιων σακχάρων ή βάσεων που καταστράφηκαν. Χαρακτηριστικό επίσης των βλαβών από ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι πως δύο ή περισσότερες βλάβες προκύπτουν στο μόριο του DNA πολύ κοντά μεταξύ τους, η καθεμία σε αντίθετο κλώνο (bistranded lesions), συνήθως σε περιοχή μίας ή δύο ελικοειδών στρωφών του μορίου. Όλες αυτές οι βλάβες που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους ονομάζονται ομαδοποιημένες και μπορεί να περιλαμβάνουν μονόκλωνες θραύσεις (ΜΚΘ), δίκλωνες θραύσεις (ΔΚΘ), οξειδωμένες αζωτούχες βάσεις (oxybases), και κανονικές ή οξειδωμένες απυριμιδικά-απυριμιδικά σημεία (AP).

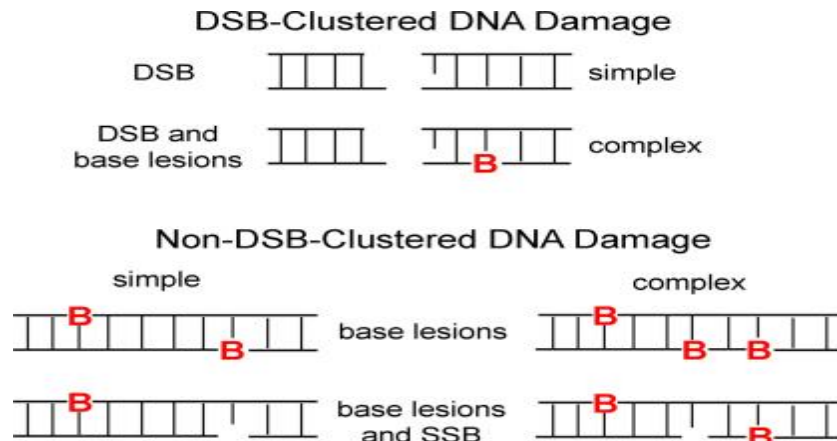
Τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας οφείλονται κυρίως στην αδυναμία διόρθωσης των ομαδοποιημένων βλαβών [9]. Ενώ οι μεμονωμένες βλάβες συνήθως διορθώνονται επαρκώς, οι ομαδοποιημένες βλάβες είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν και συνήθως θεωρούνται μη αναστρέψιμες με υψηλή μεταλλαξιγόνο δράση [10]. Μελέτες [11-13] δείχνουν πως η συχνότητα των μεταλλάξεων αυξάνει όσο μειώνεται η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών βλαβών που προκύπτουν στο DNA. Οι βλάβες αυτές είναι ανθεκτικές στις γλυκοζυλάσες<sup>12</sup> και τις ενδονουκλεάσες<sup>13</sup> και σε γενικές γραμμές τα διορθωτικά ένζυμα επιδεικνύουν καθυστερημένη απόκριση [14-18].

---

<sup>12</sup>Η γλυκοζυλάση αναγνωρίζει συγκεκριμένη βάση και υδρολύει το δεσμό ανάμεσα στη βάση και τη δεσοξυριβόζη. Δημιουργείται ένα κενό και αναγνωρίζεται ως πουρινική/απυριμιδική περιοχή και το σύστημα ενζύμων αναλαμβάνει την επιδιόρθωση,

<sup>13</sup>Ενδονουκλεάση είναι ένα είδος ενζύμου που έχει τη δυνατότητα να κόβει αλληλουχίες DNA σε συγκεκριμένα σημεία.

Στις σύνθετες βλάβες εντάσσονται οι ΔΚΘ (DSB) και οι μη-ΔΚΘ ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες.(non-DSB oxidative clustered DNA lesions/ OCDLs), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 03-12**.



Εικόνα 03-12:Σχηματική αναπαράσταση ΔΚΘ και μη-ΔΚΘ ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες. Η ΔΚΘ μπορεί να είναι είτε απλή είτε πιο περίπλοκη με αλλοιώσεις βάσης και αβασικές περιοχές. Ως μη-ΔΚΘ ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες ορίζονται δύο ή περισσότερες βλάβες μέσα σε μία ή δύο ελικοειδείς στροφές του DNA, προερχόμενες από ένα μόνο φωτόνιο ή σωματίο, που αυξάνονται σε πολυπλοκότητα με την αύξηση της LET της ακτινοβολίας. Οπου **B**: η αλλοίωση της βάσης. Πηγή:Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe(2011) LauraJ. Eccles, PeterO'Neill, and MartineE. Lomax

### 3.6.1 Οι Δίκλωνες Θραύσεις

Οι δίκλωνες θραύσεις (ΔΚΘ) αποτελούν τις πιο επικίνδυνες βλάβες που υφίσταται βιολογικά το DNA. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό μίας ΔΚΘ ως βλάβης του DNA είναι η διακοπή της μοριακής συνέχειας. Ορίζεται ως η ρήξη στο μοριακό DNA της διπλής έλικας που μπορεί να συμβεί χωρίς χημική αλλαγή σε οποιοδήποτε από τα συστατικά δομικά στοιχεία (αυτή η μορφή περιορίζεται σε ΔΚΘ που προκαλούνται από ένζυμα). Οι ΔΚΘ που παράγονται από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες μπορεί να περιλαμβάνουν στη θέση θραύσης ένα φάσμα μεταβολών βάσεων (βλάβες). Η φύση και ο αριθμός τέτοιων χημικών μεταβολών καθορίζουν την πολυπλοκότητα των ΔΚΘ και θεωρούνται οι καθοριστικοί παράγοντες για την επιλογή των μηχανισμών επιδιόρθωσης καθώς και της πιθανότητας να προκύψουν σφάλματα κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας [39]. Λόγω της φύσης τους, μπορούν να προβλεφθούν τρία σενάρια σφαλμάτων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 03-13**:

1) Αν για κάποιο λόγο η διαδικασία επιδιόρθωσης της ΔΚΘ δεν ολοκληρωθεί, τότε οι δύο κλώνοι δεν έχουν κλείσει και τα απομακρυσμένα άκρα τείνουν να ενωθούν το ένα με το άλλο.

2) Η διαδικασία της ΔΚΘ έχει ολοκληρωθεί αλλά μπορεί μετά, η ένωση να έχει τροποποιηθεί είτε ελαφρώς είτε σημαντικά.

3) Η διαδικασία της ΔΚΘ έχει ολοκληρωθεί, αλλά κατά την επιδιόρθωση μη ομόλογα άκρα συνδέονται μεταξύ τους προκαλώντας έτσι αλλοιώσεις στο γονιδίωμα που μπορούν να εμφανιστούν είτε ως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, είτε γονιδιωματικές αλλοιώσεις. Οι γονιδιωματικές αλλοιώσεις αποτελούν την πιο σοβαρή αποτυχία επεξεργασίας ΔΚΘ, καθώς παράγει νέους συνδυασμούς αλληλουχιών στο γονιδίωμα που διαταράσσουν ή απορυθμίζουν γονίδια και το οποίο μπορεί να προκαλέσει δομικές αλλοιώσεις χρωμοσωμάτων που δεν ταιριάζουν με την κανονική μιτωτική διαίρεση.

Παραδείγματα των τριών σεναρίων σφαλμάτων φαίνονται στην επόμενη εικόνα. Οι μη επιδιορθωμένες ΔΚΘ μπορούν να εμφανιστούν ως «σπασίματα» χρωματίδης ή χρωμοσώματος στη μετάφαση που ακολουθεί. ( **Εικόνα Θ3-13Α** ). Τα συμβάντα της επιδιόρθωσης τα οποία είναι επιρρεπή σε σφάλματα οδηγούν σε μεγάλες απώλειες διαδοχικών πληροφοριών αδρανοποιώντας κάποιο γονίδιο- εδώ το γονίδιο HPRT ( **Εικόνα Θ3-13Β** ). Τέλος, η λάθος ένωση των άκρων μπορεί να προκαλέσει αμοιβαίες μετατοπίσεις που μπορούν να σκοτώσουν τα κύτταρα ή να τα μετατρέψουν σε καρκινικά κύτταρα. ( **Εικόνα Θ3-13C** )

Event	Graphical Representation	Example
<b>A</b> <b>Unrepaired DSB</b>		
<b>B</b> <b>Sequence Alteration</b> (Deletion, Insertion, Modification)		
<b>C</b> <b>Translocation</b>		

Εικόνα Θ3-13: Τρία σενάρια λανθασμένης επιδιόρθωσης των ΔΚΘ. Α) Τα άκρα των ΔΚΘ απομακρύνονται έχοντας σαν αποτέλεσμα μία χρωμοσωμική αλλοίωση. Β) Μετά την επανασύνδεση των ΔΚΘ η ένωση έχει αλλάξει. Μεγάλες διαγραφές στο γονίδιο HPRT λαμβάνουν χώρα. 9 εξώνια του HPRT φαίνονται πάνω δεξιά. Με σταθερές γραμμές εμφανίζονται οι γονιδιωματικές περιοχές ενισχυμένες με αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης. Τα κενά μεταξύ των γραμμών αντιπροσωπεύουν τμήματα DNA που διαγράφονται. Γ) Η ένωση των αταίριαστων άκρων μπορεί να προκαλέσει χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Η ανάλυση υβριδισμού *in situ* φθορισμού δείχνει μετατόπιση θέσης *c-myc* / *Ig* μεταξύ χρωμοσωμάτων 8 και 14 σε κυτταρική γραμμή πολλαπλού μυελώματος. Πηγή: *DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice* (Agnes Schipler and George Iliakis)

### 3.6.2 Οι τύποι των Δίκλωνων Θραύσεων

Με βάση την αυξανόμενη πολυπλοκότητα τους οι ΔΚΘ ταξινομούνται σε 6 κατηγορίες-τύπους κατά τους Agnes Schipler and George Iliakis:

- Τύπος 1: Η απλούστερη μορφή

Κλασικά παραδείγματα των ΔΚΘ είναι αυτά που παράγονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Endonucleases-RE). Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και τις διασπούν πάντα στο ίδιο σημείο. Το RE παράγει την απλούστερη δυνατή μορφή DSB, καθώς διακόπτει τη συνέχεια

του μορίου του DNA χωρίς να μεταβάλλει χημικά οποιαδήποτε από τα συστατικά του μέρη.

- Τύπος 2: Η πολυπλοκότητα προέρχεται από τροποποιημένα άκρα

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία ΙΑ είναι ένας φυσικός παράγοντας ο οποίος ευθύνεται για τις ΔΚΘ. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία με τη μορφή ακτίνων-Χ ή ακτίνων γ προκαλεί μέσω αντιδράσεων οξειδωσης, πολλαπλές βλάβες, όπως είναι η βλάβη του σακχάρου και της βάσης, το καθένα από τα οποία υπερτερεί των DSB κατά ~20: 1. Μπορούν να προκληθούν βλάβες στη φωσφοδιεστεράση του DNA και να παραχθούν μονόκλωνες θραύσεις (ΜΚΘ). Δύο ΜΚΘ σε αντίθετους κλώνους DNA με μέγιστη μετατόπιση μέχρι 10 bp θεωρείται ότι παράγουν μία ΔΚΘ. Αυτές οι ΔΚΘ διαφέρουν από αυτές που επάγονται από τις RE. Αυτή η μορφή των άκρων αποκλείει την άμεση πρόσδεση του DNA και απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία.

- Τύπος 3: Η πολυπλοκότητα προέρχεται από την παρουσία αλλοιώσεων DNA κοντά στο σπάσιμο

Η ταυτόχρονη παρουσία των ΔΚΘ και άλλων μορφών βλάβης του DNA μέσα σε μια περιοχή βλάβης δημιουργεί το επόμενο επίπεδο πολυπλοκότητας. Η αυξημένη πολυπλοκότητα των ΔΚΘ Τύπου 3 μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την κυτταρική αποκατάσταση μέσω της ταυτόχρονης πρόσληψης, ακόμη και της δέσμευσης δύο μηχανισμών επιδιόρθωσης (π.χ. αποκατάσταση DSB και BER) σε βλάβες που βρίσκονται κοντά στο μόριο DNA.

- Τύπος 4: Η έμμεση μορφή, που προκύπτει από την επεξεργασία βλαβών βάσης εντός μιας μη-ΔΚΘ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία παράγει συστάδες βλαβών βάσης, όπως οι ΜΚΘ, οι οποίες δεν παράγουν κατευθείαν ΔΚΘ (μη ΔΚΘ). Οι ΔΚΘ μπορούν στη συνέχεια να σχηματιστούν μέσω της επεξεργασίας της βλάβης της βάσης, απέναντι από μία μη επιδιορθωμένη ΜΚΘ, ή μέσω της παράλληλης επεξεργασίας και των δύο κλώνων DNA της βλάβης βάσης. Οι έμμεσες ΔΚΘ σχηματίζονται με ταυτόχρονη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού στις θέσεις βλάβης της βάσης σε αντίθετους κλώνους DNA ή με το συνδυασμό της δραστηριότητας του BER με μια ΜΚΘ στον αντίθετο κλώνο. Έτσι δημιουργείται ένα ακόμα επίπεδο πολυπλοκότητας καθώς σχηματίζουν ένα ακόμη επίπεδο δυσκολίας που ενσωματώνει την παράμετρο του χρόνου-ακτινοβολήσης.

- Τύπος 5: Η έμμεση μορφή που προκύπτει από τη χημική επεξεργασία της βλάβης του σακχάρου του γενετικού κώδικα

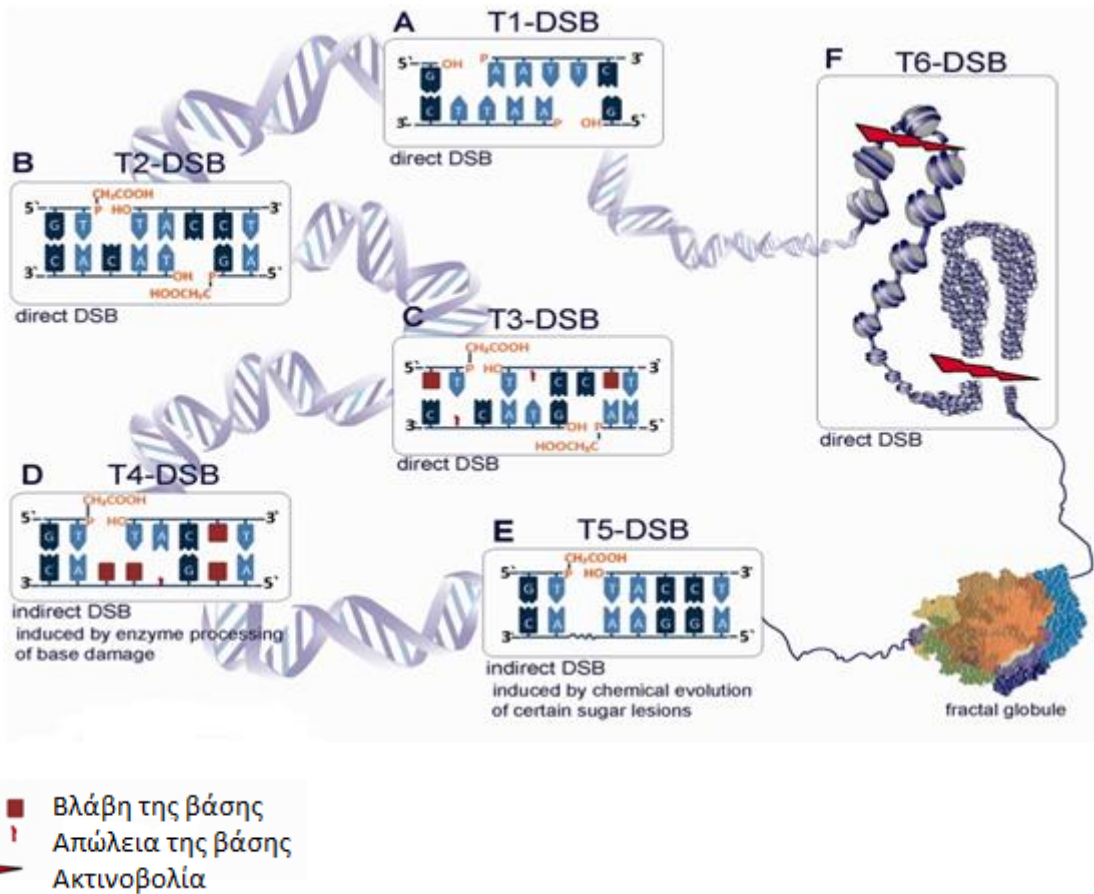
Η ιοντίζουσα ακτινοβολία επάγει θερμικά ασταθείς αλλοιώσεις, οι οποίες εξελίσσονται μέσα σε περίπου μια ώρα υπό φυσιολογικές θερμοκρασίες, σε ΜΚΘ και συνεισφέρουν, στο σχηματισμό ΔΚΘ. Οι ΔΚΘ που αργούν να σχηματιστούν παράγονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας μετά την ακτινοβολήση και προστίθενται σε άμεσες επαγόμενες ΔΚΘ.

- Τύπος 6: Η πολυπλοκότητα που προέρχεται από τη μη σταθερή κατανομή της χρωματίνης μέσω πολλαπλών, ομαδοποιημένων ΔΚΘ.

Ως ένα επιπρόσθετο επίπεδο αυξανόμενης πολυπλοκότητας ΔΚΘ. θεωρούνται οι συγκεντρωμένες ΔΚΘ όπου η καθεμία ξεχωριστά μπορεί να ανήκει σε οποιονδήποτε από τους προαναφερθέντες τύπους. Αυτή η μορφή βλάβης του DNA διακόπτει τη συνέχεια του DNA με τον ίδιο γενικά τρόπο που κάνουν οι απλούστερες μορφές των ΔΚΘ. Παρ' όλα αυτά, το γεγονός ότι υπάρχουν πολλές ΔΚΘ σε πολύ κοντινή απόσταση, επηρεάζει πολύ σοβαρά τη σταθερότητα της χρωματίνης στην περιοχή αυτή. Επομένως επηρεάζουν και τον τρόπο επεξεργασίας και αντιμετώπισης με βάση τη θέση και τη σύνθεσή τους.

Οι 6 τύποι των Δίκλωνων Θραύσεων φαίνονται στην **Εικόνα 03-14**.





Εικόνα Θ3-14. Α) T1-DSBs είναι οι άμεσες ΔΚΘ που παράγονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ένα παράδειγμα δίνεται για την EcoRI που παράγει εναλλασσόμενα) άκρα με 5'-φωσφορική και 3'-OH ομάδα. Β) T2-DSBs επάγονται από ionτίζουσες ακτινοβολίες (IA) και συχνά περιλαμβάνουν ένα 3'-φωσφογλυκολικό και ένα 5'-OH άκρο DNA όπως φαίνεται στο παράδειγμα. Γ) T3-DSB οι οποίες έχουν διεγερθεί από I.A. Σε αυτό το παράδειγμα η άμεση ΔΚΘ συνοδεύεται και από άλλους τύπους αλλοιώσεων, όπως βλάβη βάσης ή απώλεια βάσης κοντά στη ΔΚΘ. Δ) T4-DSB οι οποίες είναι μη-ΔΚΘομαδοποιημένες βλάβες που μπορούν να μετατραπούν σε ΔΚΘ μετά την ενζυμική τους επεξεργασία. Ε) T5-DSB οι οποίες (έμμεσες ΔΚΘ) που παράγονται από τη χημική επεξεργασία (με ιδανική θερμοκρασία) των κατεστραμμένων τμημάτων σακχάρου που βρίσκονται απέναντι από κάποια MKΘ. ΣΤ) T6-DSB οι οποίες αποτελούνται από ομαδοποιημένες ΔΚΘ που αποσταθεροποιήσουν τη χρωματίνη. Δύο πιθανά σενάρια απεικονίζονται: στο πρώτο σενάριο (επάνω αριστερά) η ακτινοβολία προκαλεί δύο ΔΚΘ στις περιοχές της ένωσης μεταξύ ενός νουκλεοσώματος με κίνδυνο την απώλεια νουκλεοσώματος. Το δεύτερο σενάριο (κάτω δεξιά) δείχνει μία υψηλότερη συμπύκνωση νουκλεοσωμάτων που σχηματίζουν ένα βρόχο χρωματίνης που σπάει. Εδώ είναι δυνατή η απώλεια ενός μεγαλύτερου τμήματος της χρωματίνης. Στην κάτω δεξιά γωνία του σχεδίου εμφανίζεται η ίνα χρωματίνης 10-nm, συμπιεσμένο σφαιρίδιο. Πηγή: DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice (Agnes Schipler and George Iliakis )

## 3.7 Μεταλλάξεις του DNA

Όπως έχει περιγραφεί, η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο DNA που αν δεν επιδιορθωθούν επαρκώς, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις. Με τον όρο μετάλλαξη περιγράφουμε τις δομικές μεταβολές που υφίσταται το μόριο του DNA υπό την επίδραση βιολογικών, χημικών και φυσικών παραγόντων. Οι μεταλλάξεις του DNA μπορεί να είναι είτε ενδογενείς (αυτογενείς/αυθόρμητες), είτε εξωγενείς και οι τύποι τους ποικίλουν ανάλογα με την αιτία που τις προκαλεί.

### Ενδογενείς Μεταλλάξεις

Οι ενδογενείς μεταλλάξεις συμβαίνουν αυθόρμητα στον οργανισμό και μπορεί να προκύψουν από λάθη στην αντιγραφή του DNA, λάθη οφειλόμενα σε φαινόμενα ανασυνδιασμού του DNA, σε ενζυμικά σφάλματα, στις ελεύθερες ρίζες που έχουν δημιουργηθεί ή ακόμα και λόγω της δράσης κινητών γενετικών στοιχείων. Για παράδειγμα, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA οι βάσεις προστίθενται στο μητρικό DNA βάσει της αρχής της συμπληρωματικότητας και παρόλο που σειρά ενζύμων φροντίζουν για υψηλή πιστότητα μέσω μηχανισμών επιδιόρθωσης μπορεί να προκύψει 1 λάθος ανά  $10^9$  βάσεις. Επίσης, παρατηρείται συχνά το DNA να επαναδιατάσσεται ή να ανασυνδιάζεται στα κύτταρα και η αδυναμία επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε κυτταρικό θάνατο. Τυχαίες χημικές αλλαγές όπως είναι οι αλλαγές που συμβαίνουν τυχαία στη φύση (πιθανόν σε πολυεπίπεδη επιβάρυνση του κυττάρου) είναι επίσης μία κατηγορία των ενδογενών μεταλλάξεων.

### Εξωγενείς Μεταλλάξεις

Οι εξωγενείς μεταλλάξεις είναι μεταλλάξεις που οφείλονται στην αλληλεπίδραση του DNA με το περιβάλλον. Μπορεί να προκύψουν είτε από χημικά μεταλλαξογόνα, όπως χημικά ανάλογα βάσεων (πχ 5-βρωμοουρακίλη η οποία συνδέεται στη θέση της θυμίνης), παρεμβλητικοί και ασυνδετικοί παράγοντες κ.α., είτε έκθεση σε ακτινοβολία (ιοντίζουσα και μη). Συγκεκριμένα έπειτα από την αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη, μπορούν να προκύψουν πολλαπλές βλάβες στο DNA σε περιοχή της τάξης των νανόμετρων, και οδηγούν σε επιβλαβή για την υγεία βιολογικά αποτελέσματα (μεταλλάξεις γονιδίων, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, κυτταρικός θάνατος κοκ). Ο κίνδυνος για την ανάπτυξη νεοπλασιών έπειτα από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία άρχισε επισήμως να υπολογίζεται έπειτα από την εμφάνιση πολλών περιστατικών καρκίνων στους επιζώντες από τις ατομικές βόμβες σε Χιροσίμα και Ναγκαασάκι [3]. Τα δεδομένα που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες έχουν προσδώσει το

καλύτερο μέτρο υπολογισμού του ρίσκου εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με την δόση έκθεσης σε χαμηλή γραμμική ακτινοβολία μεταφοράς ενέργειας (Low Linear Energy Transfer radiation -LET).

### 3.7.1 Τύποι μεταλλάξεων

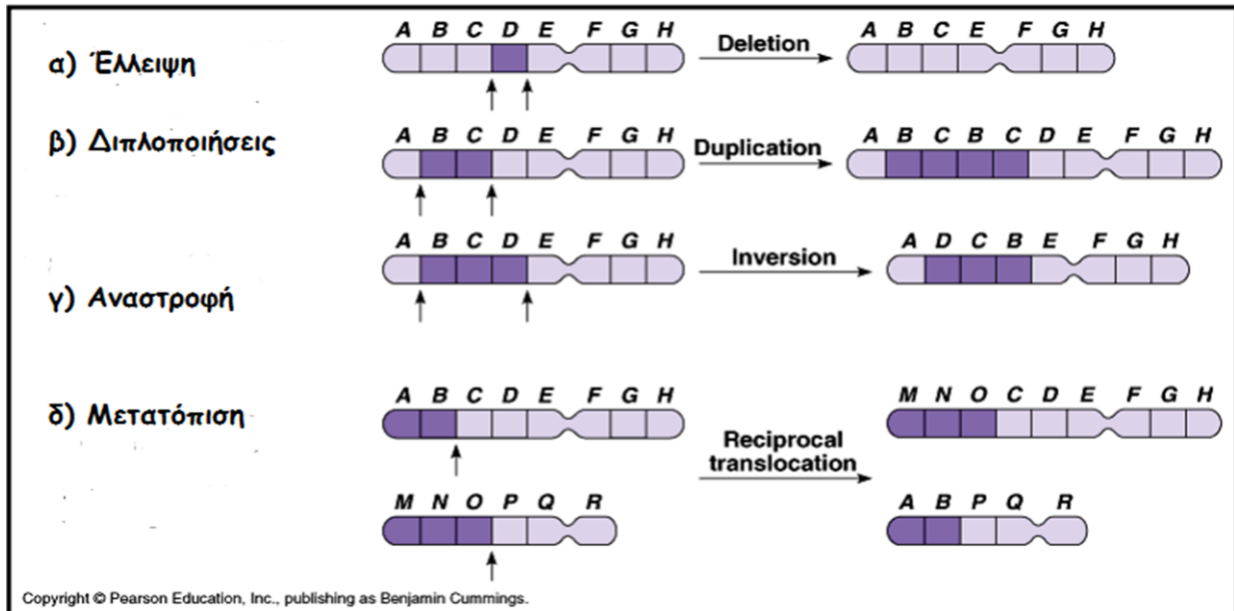
Οι μεταλλάξεις που μπορεί να προκύψουν είτε ενδογενώς είτε εξωγενώς, όπως προαναφέρθηκε, αφορούν σε μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης, προσθήκη ή απαιολογή βάσεων. Οι απλούστερες μεταλλάξεις αφορούν σε αντικαταστάσεις βάσεων όπου μια βάση μετατρέπεται σε μια άλλη. Οι αντικαταστάσεις μπορεί να είναι είτε μεταβάσεις (transitions), όπου μια πουρίνη αντικαθίσταται από άλλη πουρίνη (π.χ. Α- $\text{G}$ ), ή μια πυριμιδίνη αντικαθίσταται από άλλη πυριμιδίνη (π.χ. Τ - $\text{C}$ ) ή μεταστροφές (transversions), όπου μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη ή το αντίστροφο (π.χ. Α- $\text{C}$ )[41-42]. Οι μεταλλάξεις αυτές, ειδικά αν αλλάζουν κάποιο αμινοξύ κοντά στο ενεργό κέντρο κάποιας πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάζουν τη λειτουργία ενός ενζύμου, τη δυνατότητα κατάλυσης κάποιας αντίδρασης κλπ, αλλά μπορεί να είναι και ουδέτερες, αν η τροποποίηση που επιφέρουν δεν έχει βιολογικά αποτελέσματα ή ακόμα και σιωπηλές αν αφορούν σε τμήμα του γενετικού υλικού που δεν κωδικοποιεί κάποιο γονίδιο (πχ εσώνιο). Πιο δραστικά αποτελέσματα επιφέρουν οι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου. Αφού η μετάφραση γίνεται ανά τριπλέτα νουκλεοτιδίων, η προσθήκη ή η απαιολογή μιας ή περισσότερων βάσεων μπορεί να μετατοπίσει το πλαίσιο της μετάφρασης και να αλλάξει εντελώς τη μορφή του παραγόμενου πολυπεπτιδίου. Όλα τα αμινοξέα μετά τη μετάλλαξη θα είναι διαφορετικά από το αναμενόμενο και συχνά θα εμφανιστεί σύντομα ένα κωδικόνιο λήξης που θα σταματήσει την μετάφραση. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν έπειτα από μεταλλάξεις εναλλαγής πλαισίου είναι συνήθως μη λειτουργικές.[41,42]

### Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Όταν οι βλάβες εκτείνονται σε πολύ μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος, είναι πιθανόν να προκληθούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Με τον όρο χρωμοσωμική ανωμαλία περιγράφουμε αλλαγές είτε στη δομή είτε στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, οι οποίες συνήθως επηρεάζουν το φαινότυπο των οργανισμών που τις φέρουν. Οι πιο συνήθεις τύποι δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι οι εξής [21]:

- Οι ελλείψεις, οι οποίες συμβαίνουν όταν ένα χρωμόσωμα σπάσει σε ένα σημείο και χαθεί όλο το τελικό τμήμα (ακραία έλλειψη) ή σε δύο ενδιάμεσα σημεία και χάνεται ένα ενδιάμεσο τμήμα (ενδιάμεση έλλειψη).
- Οι διπλοποιήσεις, οι οποίες συμβαίνουν όταν ένα τμήμα επαναλαμβάνεται πάνω στο ίδιο ή σε ένα μη ομόλογο χρωμόσωμα

- Οι αναστροφές, όπου ένα τμήμα ενός χρωμοσώματος αλλάζει φορά επηρεάζοντας τη λειτουργία των γονιδίων
- Οι αμοιβαίες μετατοπίσεις, κατά τις οποίες λαμβάνει χώρα ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων ανάμεσα σε δύο μη ομόλογα χρωμοσώματα και Σχηματικά, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες απεικονίζονται στην **Εικόνα Θ3-15**.



Εικόνα Θ3-15: Τύποι χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Πηγή: Pearson Education, publishing as Benjamin Cummings

Οι αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν τις ανευπλοειδίες, οι οποίες αφορούν σε ανώμαλο αριθμό χρωμοσωμάτων, συνήθως ένα ολόκληρο χρωμόσωμα επιπλέον ή λιγότερο, (σ. Down σ. Turner αντίστοιχα), αλλά και τις πολυπλοειδίες, οι οποίες περιλαμβάνουν πολλαπλά αντίγραφα κάποιου χρωμοσώματος και είναι κατά κύριο λόγο ασύμβατες με τη ζωή είτε προ-είτε μεταγεννητικά [22].

Η αναδιάταξη μεγάλων τμημάτων του DNA μπορεί να προκαλέσει χρωμοσωμικές ανωμαλίες και απώλεια της ετεροζυγωτίας, αιτίες που είναι συνδεδεμένες με την εμφάνιση πολλών ειδών καρκίνων [23]. Οι χρωμοσωμικές αυτές μεταβολές μπορεί να προκληθούν από ΔΚΘ στο DNA, οι οποίες προκύπτουν είτε από άμεση αλληλεπίδραση με την ιοντίζουσα ακτινοβολία, είτε μέσω αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες. Τα απουρινικά-απουριμιδικά σημεία (αβασικά) αυξάνουν την πιθανότητα διάσπασης του μορίου του DNA από τις τοποϊσομεράσες I&II και μπορεί να οδηγήσουν σε ΔΚΘ.

## Βιβλιογραφία

1. Fuller K, Gulson A.D. et al (2002), Radiofrequency Electromagnetic Fields in the Cookridge Area of Leeds, NRPB-W23
2. Weiss, J. Primary processes in the action of ionizing radiations on water: formation and reactivity of self-trapped electrons (polarons<sup>•</sup>). *Nature* 1960, 186, 751-752.
3. Preston, D. L. and Piece, D. A. (2003) Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950–1997. *Radiat. Res.* 160: 381–407.
4. Kassis, A.I. and Adelstein, S.J., 2005. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(1 suppl), pp.4S-12S.
5. Sonntag, C., 1987. The chemical basis of radiation biology (p. 194). London: Taylor & Francis.
6. Ormerod, M.G. and Singh, B.B., 1966. Reaction of OH Radicals with Nucleic Acid Bases—An ESR Study. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 10(6), pp.533-538.
7. Ward, J. F. (1981) Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals. *Radiat. Res.* 86: 185–195.
8. Ward, J. F. (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res.* 104: S103–S111.
9. Lindahl, T. and Wood, R. D. (1999) Quality control of DNA repair. *Science* 286: 1897–1905.
10. Goodhead, D. T. (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 7–17.
11. Pearson, C. G., Shikazono, N., Thacker, J. and O'Neill, P. (2004) Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. *Nucleic Acids Res.* 32: 263–270.
12. Malyarchuk, S., Brame, K. L., Youngblood, R., Shi, R. and Harrison, L. (2004) Two clustered 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodG) lesions increase the point mutation frequency of 8-oxodG, but do not result in double strand breaks or deletions in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 32: 5721–5731.
13. Cunniffe, S. M., Lomax, M. E. and O'Neill, P. (2007) An AP site can protect against the mutagenic potential of 8-oxodG when present within a tandem clustered site in *E. coli*. *DNA Repair* 6: 1839–1849.
14. Chaudhry, M. A. and Weinfeld, M. (1997) Reactivity of human apurinic/aprimidinic endonuclease and *Escherichia coli* exonuclease III with bistranded abasic sites in DNA. *J. Biol. Chem.* 272(25): 15650–15655.
15. Harrison, L., Hatahet, Z. and Wallace, S. (1999) In Vitro Repair of Synthetic Ionizing Radiation-induced Multiply Damaged DNA Sites. *J. Mol. Biol.* 290: 667–684.
16. McKenzie, A. A. and Strauss, P. R. (2001) Oligonucleotides with bistranded abasic sites interfere with substrate binding and catalysis by human apurinic/aprimidinic endonuclease. *Biochemistry* 40: 3254–3261.
17. David-Cordonnier, M. H., Cunniffe, S. M. T., Hickson, I. D. and O'Neill, P. (2002) Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease. *Biochemistry* 41: 634–642.
18. Georgakilas, A. G., Bennett, P. V. and Sutherland, B. M. (2002) High efficiency detection of bistranded abasic clusters in g-irradiated DNA by putrescine. *Nucleic Acids Res.* 30: 2800–2808.
19. Ward, J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and repairability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1988. 35: p. 95-125.
20. Cadet, J., Bellon, S., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., et al. (2004). Radiation-Induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J. Env. Path. Toxicol. Oncol.* 23, 33–43.

21. Rieger, R.; Michaelis, A.; Green, M.M. (1968). "Mutation". A glossary of genetics and cytogenetics: Classical and molecular. New York: Springer-Verlag
22. Santaguida, Stefano; Amon, Angelika (2015-08-01). "Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16 (8): 473–485.
23. Lengauer, C. et al. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649
24. Nasa Cosmicopia: Cosmic Rays, Energetic Particles, and Plasma
25. Princeton's Open Source Radiation Safety Training, Module 3: Biological Effects
26. DOE Openness: Human Radiation Experiments: Roadmap to the Project-ACHRE Report. Ionizing Radiation
27. Παρουσίαση του Εργαστηρίου Ερευνητικού Αντιδραστήρα/Ινστιτούτο Πυρηνικής Τεχνολογίας και Ακτινοπροστασίας Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος»/Σταματελάτος.
28. Παρουσίαση του καθηγητή Γ.Τσιπολίτη (Ε.Μ.Π) στα πλαίσια του μαθήματος Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες. [<http://www.physics.ntua.gr/~yorgos/med/mathimata.pdf>]
29. International Commission on Radiation Units and Measurements (October 2011). Seltzer, Stephen M., ed. "Report 85: Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation". *Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements (Revised ed.)*
30. International Commission on Radiation Units and Measurements (1970). *Linear Energy Transfer*. Washington D.C. doi:10.1093/jicru/os9.1.Report16. ISBN 978-0913394090. ICRU report 16.
31. Takatsuji T, Yoshikawa I, Sasaki MS. Generalized concept of the LET-RBE relationship of radiation-induced chromosome aberration and cell death. *J Radiat Res*40(1):59–69; 1999.
32. Γραμματικός Φ. Κ. (1985) : Πρακτικές Εφαρμογές και βασικές αρχές της Πυρηνικής Ιατρικής. University Studio Press (Θεσσαλονίκη).
33. Πανεπιστήμιο Πατρών, Καθηγήτης Δημήτριος Καρδαμάκης «Ακτινοβιολογία - Ακτινοθεραπεία –Ακτινοπροστασία, Πάτρα 2015. [<https://eclass.upatras.gr>]
34. D.F Williams, L.M. Toth, and K. T. Clarno, Assessment of candidate molten salt coolants for the advanced high- temperature reactor (AHTR), Oak Ridge National Laboratory, ORNL/TM-2006/12, March 2006
35. D.F. Williams, Assessment of candidate molten salt coolants for the NNGP/NHI heat-transfer loop, Oak Ridge National Laboratory, ORNL/TM-2006/69, June 2006
36. Sophie Le Caër /Institut Rayonnement Matière de Saclay, Service Interdisciplinaire sur les Systèmes Moléculaires et les Matériaux, UMR 3299 CNRS/CEA SIS2M, Laboratoire de Radiolyse, Bâtiment 546, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France: *Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation* (2011)
37. W.F. Morgan, M.B. Sowa, Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation, *Mutat. Res.* 616 (2007)
38. Single-strand break repair and genetic disease. Caldecott KW<sup>1</sup>. (2008)
39. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice Agnes Schipler and George Iliakis\*
40. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe? Laura J. Eccles, Peter O'Neill, and Martine E. Lomax
41. Παρουσίαση του καθηγητή Δρ. Κωνσταντίνου Ε. Βοργιά (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών) με τίτλο «Μεταλλάξεις DNA» [<https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL199/META%CE%9B%CE%9B%CE%91%CE%9E%CE%95%CE%99%CE%A3.pdf>]
42. Παρουσίαση του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο «Μοριακή Ογκογένεση (Molecular Oncogenesis)»
43. Παρουσίαση Α. Γεωργακίλα με τίτλο «Συσχετισμός μηχανισμών επαγωγής βλαβών DNA, απόκριση με καρκινογένεση. Πειραματική και βιοπληροφορική ανάλυση.» [[http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB198/PAROYSIASH\\_7\\_Georgakilas\\_2017.pdf](http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB198/PAROYSIASH_7_Georgakilas_2017.pdf)]

## Κεφάλαιο 4: Επιδιόρθωση βλαβών DNA

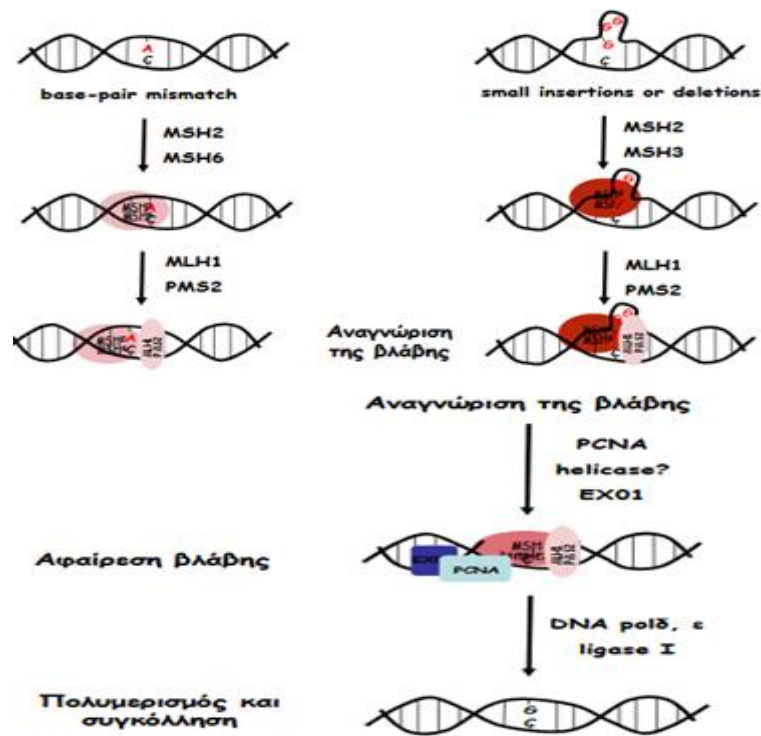
### 4.1 Επιδιόρθωση βλαβών DNA

Οι ενδογενείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου αξιοποιούνται για τον πειραματικό εντοπισμό και την ποσοτική καταγραφή των βλαβών που υφίσταται το γονιδίωμα. Αναγνωρίζουν τις βλάβες στο DNA και τις επιδιορθώνουν χρησιμοποιώντας ως «καλούπι» την πληροφορία από τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Οι μηχανισμοί αυτοί δίνονται στη συνέχεια.

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

Η μέθοδος Επιδιόρθωσης Αναντιστοιχίας διορθώνει λάθη τοποθέτησης ενός νουκλεοτιδίου ή «τυπογραφικά λάθη» που εμφανίζονται κατά την αντιγραφή του DNA (προσθήκη 1-4 βάσεων/ απαλοιφή 1-4 βάσεων/ εισδοχή μη συμπληρωματικής βάσης). Η απενεργοποίηση του MMR έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA και σε αύξηση της συχνότητας των μεταλλάξεων. Σφάλματα στο μηχανισμό MMR προδιαθέτουν για καρκινογένεση στον άνθρωπο.

Η αρχή λειτουργίας του MMR φαίνεται στην **Εικόνα 04-1**.



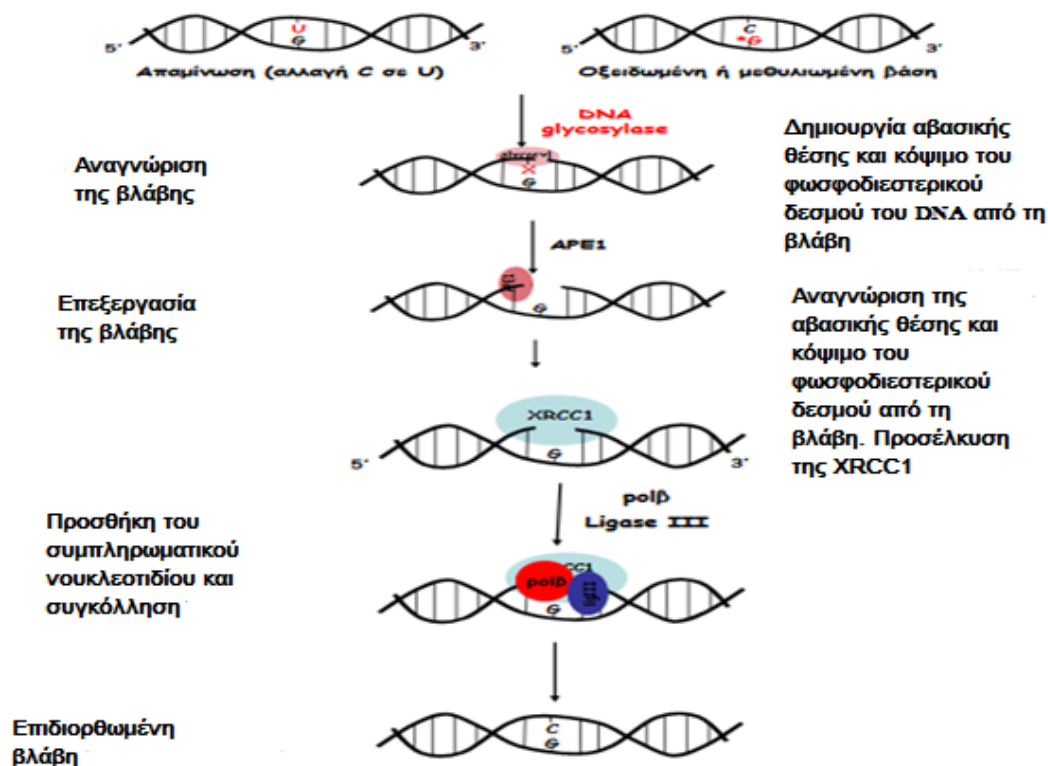
Εικόνα Θ4-1: Η αρχή λειτουργίας του MMR Αρχικά αναγνωρίζεται η βλάβη και στη συνέχεια ξετυλίγεται ο έλικας (ελικάση). Η βλάβη αφαιρείται (ενδονουκλεάση) και ακολουθεί ο πολυμερισμός και η συγκόλληση (πολυμεράση και λιγάση). Πηγή: Διάλεξη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης με θέμα «Επιδιόρθωση βλαβών του DNA».

#### 4.1.2 Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair-BER)

Η μέθοδος επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (base excision repair - BER) είναι μία μέθοδος που διορθώνει μικρές βλάβες στην αλληλουχία του DNA και διορθώνει αλλοιώσεις (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, απαμίνωση) της βάσης νουκλεοτιδίου. Είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως για την επιδιόρθωση μονόκλωνων θραύσεων. Ο μηχανισμός BER ενεργοποιείται από τις γλυκοζυλάσες του DNA, οι οποίες αναγνωρίζουν και απομακρύνουν ακατάλληλες βάσεις δημιουργώντας αβασικά (απουρινικά/απυριμιδινικά) σημεία. Στη θέση του αβασικού σημείου προσέρχεται μία περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία υδρολύει τον φωσφοδιεστερικό τους δεσμό δημιουργώντας μία μονόκλωνη θραύση στο πολυνουκλεοτίδιο. Αυτή η θραύση έπειτα αντιμετωπίζεται με σύνθεση εκ νέου του τμήματος των νουκλεοτιδίων που λείπουν. Σε αυτήν την περίπτωση, οι πρωτεΐνες PARP (ADP-ribose polymerase), οι οποίες είναι πυρηνικές πρωτεΐνες που απαντώνται στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αναγνωρίζουν τα σημεία των θραύσεων και προσδένονται, εκκρίνοντας το κατάλληλο σήμα που ενεργοποιεί τις απαραίτητες πρωτεΐνες ώστε να ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση (όπως είναι π.χ. οι κατάλληλες DNA πολυμεράσες που δημιουργούν το τμήμα που λείπει με βάση το συμπληρωματικό του) [16].



Η αρχή λειτουργίας του BER φαίνεται στην **Εικόνα Θ4-2**.



Εικόνα Θ4-2: Η αρχή λειτουργίας του BER. Αναγνωρίζεται η βλάβη και οι γλυκοζυλάσες του DNA, απομακρύνουν ακατάλληλες βάσεις δημιουργώντας αβασικά (απουρινικά/απυριμιδινικά) σημεία. Στη θέση αυτή προσέρχεται μία περιοριστική ενδονουκλεάση και κόβει τον φωσφοδιεστερικό τους δεσμό δημιουργώντας μία μονόκλωνη θραύση. Στη συνέχεια, προστίθεται συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο και συγκολλάται και έτσι η βλάβη επιδιορθώνεται. Πηγή: Διάλεξη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης με θέμα «Επιδιόρθωση βλαβών του DNA».

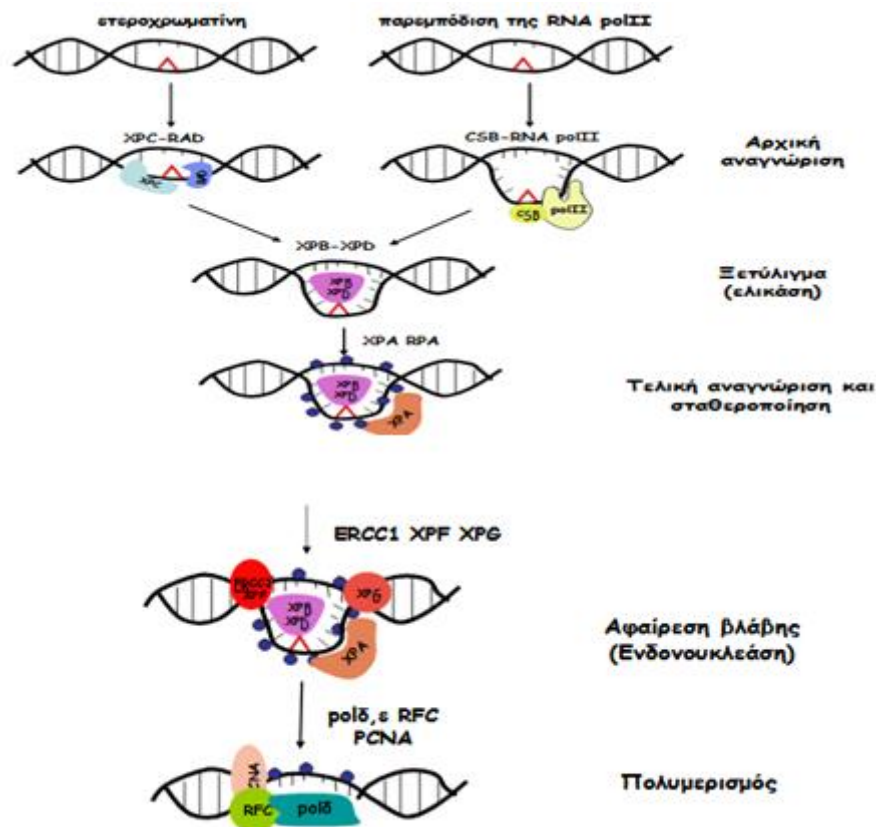
#### 4.1.3 Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair-NER)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου (nucleotide excision repair - NER) αντιμετωπίζει πιο σύνθετες βλάβες από τον BER οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν παραμόρφωση στο σχήμα της διπλής έλικας, όπως ο σχηματισμός διμερών πυριμιδίνης και η ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων. Τέτοιες βλάβες μπορούν να προκληθούν από χημικά καρκινογόνα και την υπεριώδη ακτινοβολία. Ο NER λειτουργεί σταδιακά εμπλέκοντας πάνω από 30 είδη πρωτεϊνών στον μηχανισμό της και αντικαθιστά μεγάλα τμήματα DNA (~ 30 νουκλεοτίδια), αποκόπτοντας το κομμάτι που

έχει υποστεί βλάβη και συνθέτοντάς το εκ νέου, βάσει της συμπληρωματικής αλυσίδας [17]. Ο μηχανισμός NER διακρίνεται σε δύο υπομηχανισμούς, μονοπάτια, τα οποία έχουν αντίστοιχα στάδια και διαφέρουν μόνο στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο αρχικό στάδιο αναγνώρισης της βλάβης:

- 1) Transcription Coupled Repair (TCR): επιδιορθώνει βλάβες που εμποδίζουν την RNApolIII και επιδιορθώνει γονίδια που εκφράζονται.
- 2) Global Genomic Repair (GGR): επιδιορθώνει βλάβες σε ολόκληρο το γονιδίωμα και σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες δεν εκφράζονται και στη σιωπηλή χρωματίνη.

Η αρχή λειτουργίας του NER φαίνεται στην **Εικόνα Θ4-3**.



Εικόνα Θ4-3: Η αρχή λειτουργίας του NER. Διακρίνονται δύο υπομηχανισμοί-μονοπάτια: 1. Transcription Coupled Repair (TCR) και 2. Global Genomic Repair (GGR) Αρχικά αναγνωρίζεται η βλάβη και ξετυλίγεται η ελικάση. Ακολουθεί η τελική αναγνώριση και σταθεροποίηση και αφαιρείται η βλάβη. Τέλος, ακολουθεί ο πολυμερισμός και η βλάβη επιδιορθώνεται. Πηγή: Διάλεξη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης με θέμα «Επιδιόρθωση βλαβών του DNA».

Στην περίπτωση των ΔΚΘ, όπου λείπει το υγιές εκμαγείο της συμπληρωματικής αλυσίδας, είναι απαραίτητη πιο λεπτομερής επιδιόρθωση και πιο πολύπλοκοι

μηχανισμοί, όπως ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination - HR) και η Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Non Homologous End Joining -NHEJ).

#### 4.1.4 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination-HR)

Ο ομόλογος Ανασυνδυασμός (HR) είναι ένας αρκετά πολύπλοκος αλλά και ακριβής μηχανισμός επιδιόρθωσης ΔΚΘ, ο οποίος μπορεί να χωριστεί στις ακόλουθες υποκατηγορίες: συνθετο- εξαρτώμενος ανασυνδυασμός αλυσίδας (synthesis-dependent strand annealing - SDSA), αντιγραφή επαγόμενη από θραύση (break-induced replication - BIR) και μονόκλωνος ανασυνδυασμός (single-strand annealing - SSA)

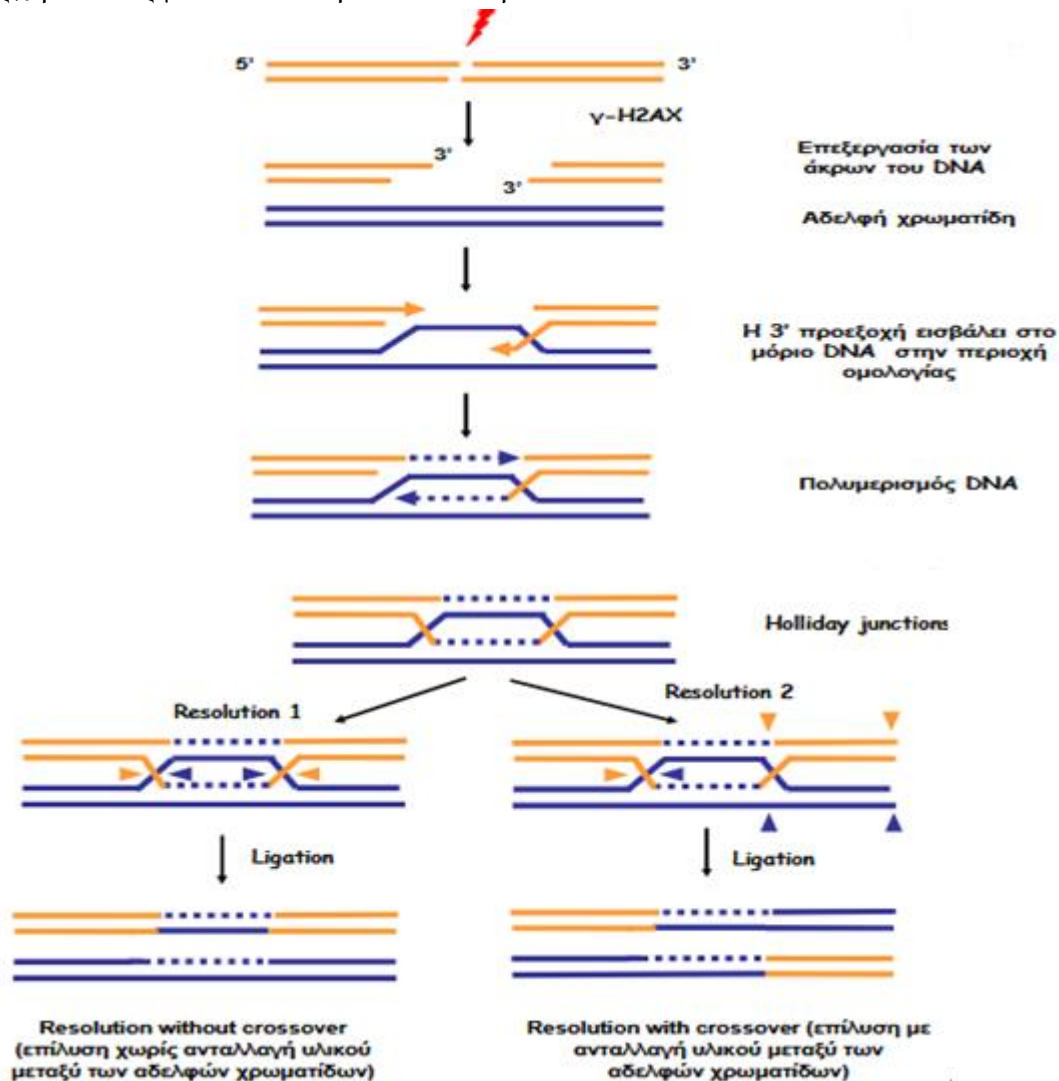
Εκτός από το ρόλο που διαδραματίζει στη διατήρηση του γονιδιώματος, ο HR παίζει σημαντικό ρόλο στην πιστή αναπαραγωγή του γονιδιώματος παρέχοντας κρίσιμη υποστήριξη για την αντιγραφή του DNA και τη συντήρηση των τελομερών.

Ο HR εκκινά από την τελική εκτομή του DNA που περιλαμβάνει το σύμπλεγμα MRE11-RAD50-NBN και αρκετούς παράπλευρους παράγοντες, όπως τις νουκλεάσες [18] και δημιουργείται ένα ρήγμα στο μόριο του DNA.

Καθώς προχωρά η εκτομή κατά μήκος της δεσοξυριβονουκλεϊκής αλυσίδας δημιουργείται μονόκλωνο DNA (single stranded DNA- ssDNA). Στο περιβάλλον του πυρήνα το ssDNA συνδέεται αρχικά με την πρωτεΐνη RPA (replication protein A), η οποία αντικαθίσταται μετέπειτα από την RAD51. Η RPA είναι η ετεροτριμερής πρωτεΐνη δεσμεύσεως ssDNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα και εμπλέκεται σε όλες τις μεταβολικές διεργασίες του DNA που περιλαμβάνουν ssDNA. Η πρωτεΐνη RAD51 μετατρέπει το ssDNA σε μια ομόλογη δίκλωνη αλυσίδα DNA η οποία λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση τμημάτων DNA και την τελική επιδιόρθωση της βλάβης. [37-39]. Τα 5' άκρα του ρήγματος αποδομούνται από ένα ένζυμο αφήνοντας τα άκρα 3' να προεξέχουν. Καθένα από αυτά τα μονόκλινα τμήματα αναζητά μια ομόλογη συμπληρωματική αλυσίδα για να ζευγαρώσει. Οι εγκοπές στους κλώνους του DNA σφραγίζονται, ώστε τα δύο μόρια του DNA να συγκρατούνται χιαστί (cross-strand exchange) [40].

Η μέθοδος HR είναι η πιο ακριβής, όμως χρειάζεται να υπάρχει κοντά στο σημείο της ΔΚΘ μια πανομοιότυπη αλληλουχία DNA, η οποία μπορεί να βρεθεί είτε στην αδελφή χρωματίδη είτε στο ομόλογο χρωμόσωμα. Αφού η αδελφή χρωματίδη υπάρχει μόνο κατά τη φάση S και τη G2, η μέθοδος του ομόλογου ανασυνδυασμού προτιμάται μόνο κατά τις συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Σημειώνεται ότι η τυχόν απενεργοποίηση γονιδίων του HR οδηγεί σε αστάθεια του γονιδιώματος (χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, ανευπλοειδία) και προδιαθέτει σε καρκινογένεση.

Η αρχή λειτουργίας του HR φαίνεται στην **Εικόνα Θ4-4**.



Εικόνα Θ4-4: Η αρχή λειτουργίας του HR. Ο HR εκκινά από την τελική εκτομή του DNA. Η πρωτεΐνη RAD51 μετατρέπει το ssDNA σε μια ομόλογη δίκλωνη αλυσίδα DNA η οποία λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση τμημάτων DNA και την τελική επιδιόρθωση της βλάβης. Τα 5' άκρα του ρήγματος αποδομούνται από ένα ένζυμο αφήνοντας τα άκρα 3' να προεξέχουν. Καθένα από αυτά τα μονόκλινα τμήματα αναζητά μια ομόλογη συμπληρωματική αλυσίδα για να ζευγαρώσει. Το DNA πολυμερίζεται και τελικά οδηγεί σε δύο επιλύσεις: Μία χωρίς ανταλλαγή υλικού και άλλη μία με ανταλλαγή υλικού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Πηγή: Διάλεξη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης με θέμα «Επιδιόρθωση βλαβών του DNA».

#### 4.1.5 Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Non-Homologous End-Joining – NHEJ)

Η Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (NHEJ), είναι ο κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης των ΔΚΘ σε κύτταρα θηλαστικών κατά την φάση G1, οπότε απουσιάζουν οι αδελφές χρωματίδες. Είναι επιρρεπής σε σφάλματα (απώλεια λίγων νουκλεοτιδίων), αλλά αποτελεί ταυτόχρονα μια γρήγορη επισκευή χωρίς να απαιτείται η ύπαρξη ομολογίας με άλλο μόριο DNA. Η απενεργοποίηση των γονιδίων του NHEJ συσχετίζεται με αστάθεια γονιδιώματος, ακτινοευαισθησία και καρκινογένεση στα ποντίκια και στον άνθρωπο.

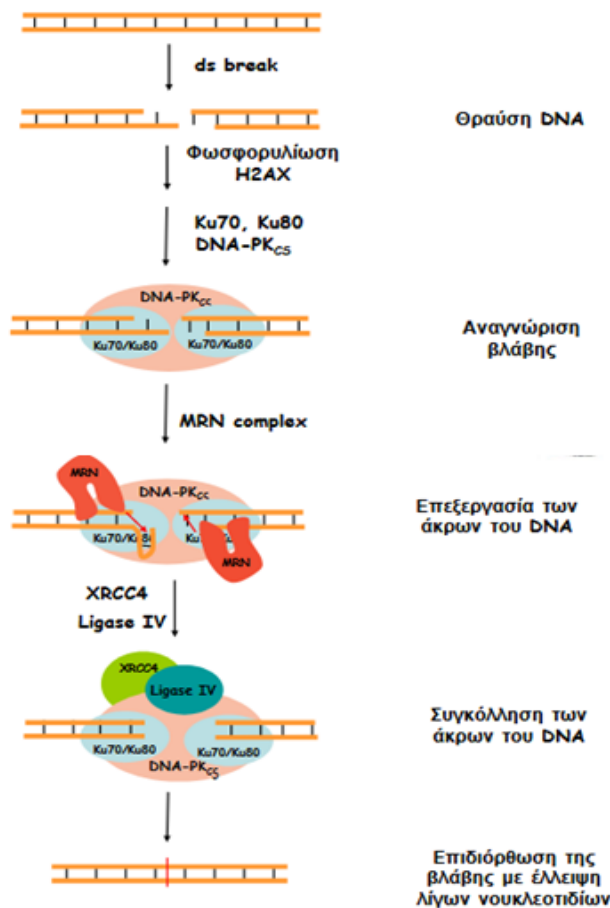
Τα κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα του NHEJ είναι το DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase -αναγνώριση της βλάβης), MRN (επεξεργασία της βλάβης), DNA LigaseIV/XRCC4 (συγκόλληση των άκρων του DNA). Το πρώτο στάδιο της NHEJ αφορά τον εντοπισμό της δίκλωνης θραύσης. Το σύμπλοκο DNA-PK είναι ένα πενταμερές που αποτελείται από δύο ετεροδιμερή των πρωτεϊνών Ku70 και Ku80 και την καταλυτική υπομονάδα DNA-PK<sub>cs</sub>. Η DNA-PK<sub>cs</sub> είναι αναγκαία για την προσέλευση και την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών που επεξεργάζονται τα σπασμένα άκρα. Η κινάση ATM φωσφορυλιώνει π.χ την ιστόνη H2AX, στη θέση της σερίνης 139, στο C-τελικό της άκρο [18]. Έπειτα το τοροειδές ετεροδιμερές Ku70/80 προσδένεται σε κάθε άκρο της δίκλωνης θραύσης και λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της NHEJ.

Αφού γίνει η ΔΚΘ τα άκρα του DNA είναι δύσκολο να επανασυγκολληθούν και έτσι απαιτείται επεξεργασία. Η επεξεργασία των άκρων γίνεται με το σύμπλοκο MRN το οποίο παρουσιάζει ενδονουκλεοτική ενεργότητα σε 5' και 3' προεξοχές και φουρκέτες DNA.

Έπειτα λαμβάνει χώρα η επεξεργασία των μη συμπληρωματικών άκρων, όπου οι κινάσες DNA-PK<sub>cs</sub> κάθε άκρου της ΔΚΘ ενώνονται γεφυρωτικά. Αυτή η διεργασία πυροδοτεί μια αυτοφωσφορυλίωση της κινάσης η οποία καταλύει τη σύνδεση των άκρων της θραύσης.

Το τελικό στάδιο είναι η συγκόλληση των επεξεργασμένων άκρων η οποία επιτελείται από το σύμπλοκο DNA ligaseIV/ XRCC4 των οποίων η αλληλεπίδραση σταθεροποιεί το σύμπλοκο. Οι πρωτεΐνες προσελκύουν αυτό το σύμπλοκο στις άκρες του DNA και η DNA-PK<sub>cs</sub> το ενεργοποιεί με σκοπό τη συγκόλληση των άκρων του DNA.

Η αρχή λειτουργίας του NHEJ στην **Εικόνα 04-5**.



Εικόνα Θ4-5: Αρχή λειτουργίας του NHEJ. Αρχικά εντοπίζεται η δίκλωνη θραύση. Η DNA-PK<sub>cs</sub>, που αποτελείται από δύο ετεροδιμερή των πρωτεϊνών Ku70 και Ku80 και την καταλυτική υπομονάδα DNA-PK<sub>cs</sub>, προσελκύει και φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες που επεξεργάζονται τα σπασμένα άκρα. Το τοροειδές ετεροδιμερές Ku70/80 προσδένεται σε κάθε άκρο της δίκλωνης θραύσης και λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της NHEJ. Η επεξεργασία των άκρων γίνεται με το σύμπλοκο MRN και ακολουθεί η επεξεργασία των μη συμπληρωματικών άκρων. Τέλος ακολουθεί η συγκόλληση των επεξεργασμένων άκρων η οποία επιτελείται από το σύμπλοκο DNA ligase IV/ XRCC4 των οποίων η αλληλεπίδραση σταθεροποιεί το σύμπλοκο. Η βλάβη έχει επιδιορθωθεί με έλλειψη λίγων νουκλεοτιδίων. Πηγή: Διάλεξη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης με θέμα «Επιδιόρθωση βλαβών του DNA».

## 4.2 Επιδιόρθωση βλαβών στην περιοχή της ετεροχρωματίνης

Η διαδικασία της επιδιόρθωσης βλαβών, η οποία περιγράφηκε παραπάνω, είναι πιο απλή στην περιοχή της ευχρωματίνης. Στις περιοχές, όμως, όπου υπάρχει η πολύ πιο συμπυκνωμένη μορφή της ετεροχρωματίνης, ο μηχανισμός που απαιτείται είναι πιο περίπλοκος.

Ειδικά όσον αφορά τις ΔΚΘ, όπου ακόμα και μία -αν παραμείνει αδιόρθωτη- μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιωματική αστάθεια και να συμβάλλει έτσι στην καρκινογένεση [19-20]. Οι πρωτεΐνες ελέγχου και επιδιόρθωσης επεμβαίνουν μέσα σε δευτερόλεπτα από την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία [21-22] και συσσωρεύονται γύρω από τη ΔΚΘ, δημιουργώντας εστίες επιδιόρθωσης. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των περιοχών της ετεροχρωματίνης, που δυσκολεύει τη διαδικασία της επιδιόρθωσης των ΔΚΘ, είναι πως περιέχει πολλές επαναλήψεις των ίδιων ακολουθιών DNA [23], γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού HR σε λάθη. Συγκεκριμένα, η πληθώρα αυτών των επαναλήψεων στις περικεντρομερικές ετεροχρωματικές περιοχές διαφόρων χρωμοσωμάτων μπορεί να προκαλέσει ασύμμετρες εναλλαγές αδελφών χρωματίδων ή ενδο- και διαχρωμοσωμικό ανασυνδυασμό, οδηγώντας σε εκτομές, μετατοπίσεις ή και δημιουργία δικεντρικών ή ακεντρικών χρωμοσωμάτων [24-26]. Παρόλον τον κίνδυνο του λανθασμένου ανασυνδυασμού, οι ΔΚΘ στην περιοχή της ετεροχρωματίνης αντιμετωπίζονται επαρκώς με τη μέθοδο HR. Μελέτες σε κύτταρα της *Drosophila* και ποντικών έδειξαν πως παρά την ιδιαίτερα συμπυκνωμένη φύση της ετεροχρωματίνης, ο εντοπισμός και η επιδιόρθωση των βλαβών δεν καθυστερεί σε σύγκριση με τις περιοχές της ευχρωματίνης [27-28], γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες οι οποίες έδειχναν πως η συμπυκνωμένη μορφή της ετεροχρωματίνης δε μπλοκάρει την είσοδο ή την ανταλλαγή μορίων [29]. Αυτές οι μελέτες ανέτρεψαν την ιδέα πως η ετεροχρωματίνη αντιστέκεται στην επιδιόρθωση των ΔΚΘ, παράλληλα όμως μελέτες σε ποντίκια έδειξαν πως η επιδιόρθωση παίρνει πράγματι περισσότερο χρόνο σε αυτόν τον τομέα, γεγονός που καταδεικνύει πως η διαδικασία της επιδιόρθωσης επιβραδύνεται σε επόμενα στάδια [30]. Η εξέλιξη του HR από ένα σημείο και μετά, σταματά στον τομέα της ετεροχρωματίνης από τη διαδικασία της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης SUMO, ώστε να αποφευχθεί ο εσφαλμένος ανασυνδυασμός. Παρόλο που τα αρχικά στάδια του HR λαμβάνουν χώρα κανονικά στον τομέα της ετεροχρωματίνης, η πρόσδεση του παράγοντα Rad51, που είναι απαραίτητος για την εξέλιξη της διαδικασίας, δε συμβαίνει έως ότου να μετατοπιστεί το τμήμα με τη ΔΚΘ εκτός ετεροχρωματικού τομέα [31]. Οι συνδετάσες SUMO E3 προσδένονται στο ετεροχρωματικό σημείο ΔΚΘ πριν τη μετατόπιση [32], ώστε να αποτρέψουν τη σύνδεση του RAD51 που θα μπορούσε να οδηγήσει σε εσφαλμένο ανασυνδυασμό. Οι ετεροχρωματικές εστίες ΔΚΘ επανατοποθετούνται στην περιφέρεια του πυρήνα ώστε να συνεχίσει ο HR [32]. Η εξέλιξη του HR στην πυρηνική περιφέρεια χρειάζεται την παρουσία “δωρητών” αλληλουχιών, [34] και έτσι οι αδελφές χρωματίδες ή το ομόλογο χρωμόσωμα μετατοπίζονται μαζί με τη βλάβη στην πυρηνική περιφέρεια. Συνήθως, προτιμάται η αδελφή χρωματίδη, όταν είναι διαθέσιμη, ως εκμαγείο για την επιδιόρθωση.

Η ανακάλυψη μετακινήσεων μεγάλης έκτασης για τις εστίες επιδιόρθωσης έδειξε πως στα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπου υπάρχουν πολλά αντίγραφα μιας αλληλουχίας, η μετατόπιση είναι απαραίτητη για την αποφυγή ανώμαλου ανασυνδυασμού. Ακόμα δεν έχει βρεθεί ο μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα κύτταρα ώστε να αναγνωρίσουν μια

ετεροχρωματική ΔΚΘ και να ενεργοποιήσουν αυτή την ειδική διαδικασία επιδιόρθωσης. Φαίνεται όμως πως το ιδιαίτερο περιβάλλον της ετεροχρωματίνης παίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτό. Μελέτες στα κύτταρα της *Drosophila* έδειξαν πως οι παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη σίγαση της ετεροχρωματίνης (όπως π.χ. οι Su(var)3-9, SetDB1 και HP1a) είναι απαραίτητα για το μπλοκάρισμα της πρόσδεσης του Rad51 και την παύση του HR στο ετεροχρωματικό περιβάλλον.

Συμπερασματικά, η πάκτωση της ετεροχρωματίνης και το ειδικό της περιβάλλον, μπορούν να επηρεάσουν τα αρχικά στάδια επιδιόρθωσης κάποιας εστίας βλάβης σε αυτή την περιοχή με τους ακόλουθους τρόπους: (α) προωθώντας το σήμα για τη δίκλωνη θραύση και την εκτομή της οδηγώντας έτσι την ΔΚΘ προς το μηχανισμό HR, (β) παύοντας την εξέλιξη του HR μετά την εκτομή του τμήματος και έως ότου μετατοπιστεί η εστία και (γ) προκαλώντας αυτή τη μετατόπιση μέσω της εκτομής και της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης SUMO. Απουσία βλάβης, η ετεροχρωματική περιοχή είναι πολύ υψηλά συμπιεσμένη και εμφανίζει ελάχιστη δυναμική. Η δημιουργία όμως των ΔΚΘ οδηγεί σε αποσυμπύκνωση αυτής της περιοχής η οποία ξεκινά αμέσως μετά την έκθεση σε ακτινοβολία και τη δημιουργία της βλάβης [35]. Στα κύτταρα της *Drosophila*, η επέκταση οδηγεί στην κατάληψη 50% περισσότερου όγκου στον πυρήνα από τις εστίες επιδιόρθωσης και υπεύθυνες για αυτήν την επέκταση είναι οι κινάσες ελέγχου και ειδικά η ATR, και είναι ακριβώς οι ίδιες κινάσες που ευθύνονται για τον εντοπισμό και τη μετατόπιση της εστίας ΔΚΘ [24]. Πρόσφατες μελέτες σε ζυμομύκητες έδειξαν πως οι πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μορφή της χρωματίνης αλλά και η αποικοδόμηση της ιστόνης ως αποτέλεσμα ελέγχου είναι οι κύριοι παράγοντες για τη δυναμική της ετεροχρωματίνης κατά τη διάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού, οδηγώντας σε μια πιο προσβάσιμη μορφή [36].



## Βιβλιογραφία

1. Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG and Ravanat J-L (2015) Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front. Chem.* 3:35.
2. Ravanat, J.-L. (2012). Chromatographic methods for the analysis of oxidatively damaged DNA. *Free Radic. Res.* 46, 479–491.
3. Floyd, R. A., Watson, J. J., and Wong, P. K. (1984). Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 221–235.
4. Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E., and Sage, E. (2000). Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 26732–26742.
5. Breton, J., Sichel, F., Bianchini, F., and Prevost, V. (2003). Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a commercial available ELISA test: comparison with HPLC/Electrochemical detection in calf thymus DNA and determination in human serum. *Anal. Lett.* 36, 123–134.
6. Pflaum, M., and Epe, B. (2000). "Measuring oxidative DNA damage by alkaline elution," in *Measuring in vivo Oxidative Damage: A Practical Course*, eds. J. Lunec and H. R. Griffiths (Chichester: John Wiley & Sons, LTD), 95–104.
7. Boysen, G., Collins, L. B., Liao, S., Luke, A. M., Pachkowski, B. F., Watters, J. L., et al. (2010). Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultra high pressure liquid chromatography-heat assisted electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 878, 375–380.
8. Georgakilas, A. (2011). Detection of clustered DNA lesions: biological and clinical applications. *World J. Biol. Chem.* 2, 173–176.
9. Georgakilas, A. G., Holt, S. M., Hair, J. M., and Loftin, C. W. (2010). Measurement of oxidatively-induced clustered DNA lesions using a novel adaptation of single cell gel electrophoresis (comet assay). *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 6:Unit 6.11.
10. Douki, T., Ravanat, J.-L., Angelov, D., Wagner, R. J., and Cadet, J. (2004). Effects of duplex stability on charge-transfer efficiency within DNA. *Top. Current. Chem.* 236, 1–25.
11. Douki, T., Ravanat, J.-L., Pouget, J.-P., Testard, I., and Cadet, J. (2006). Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 119–127.
12. Rothkamm, K., and Horn, S. (2009). gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann. Ist. Super. Sanita* 45, 265–271.
13. Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sidorkina, O., and Laval, J. (2000). Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing

- radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 103–108.
14. Sutherland, B. M., Georgakilas, A. G., Bennett, P. V., Laval, J., and Sutherland, J. C. (2003). Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis. *Mutat. Res.* 531, 93–107.
  15. Asaithamby, A., Hu, B., and Chen, D. J. (2011). Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8293–8298.
  16. Liu Y, Prasad R, Beard WA et al. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta. *J. Biol. Chem.* 282(18), 13532–13541 (2007).
  17. Barakat K, Tuszyński J. Nucleotide excision repair inhibitors: still a long way to go. In: *New Research Directions In DNA Repair*. Chen PC (Ed). InTech (2013).
  18. Nikitaki, Zacharenia & Michalopoulos, Ioannis & Georgakilas, Alexandros. (2015). Molecular inhibitors of DNA repair: Searching for the ultimate tumor killing weapon. *Future medicinal chemistry.* 26. 1-16. 10.4155/FMC.15.95.
  19. S.E. Lee, J.K. Moore, A. Holmes, K. Umezū, R.D. Kolodner, J.E. Haber, *Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/Marrest after DNA damage*, *Cell* 94 (3) (1998) 399–409.
  20. T. Helleday, J. Lo, D.C. van Gent, B.P. Engelward, DNA double-strand breakrepair: from mechanistic understanding to cancer treatment, *DNA Repair(Amst)* 6 (7) (2007) 923–935.
  21. S.V. Costes, A. Boissiere, S. Ravani, R. Romano, B. Parvin, M.H. Barcellos-Hoff, Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts, *Radiat. Res.* 165 (5) (2006) 505–515.
  22. E.L. Leatherbarrow, J.V. Harper, F.A. Cucinotta, P. O'Neill, Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation, *Int. J.Radiat. Biol.* 82 (2) (2006) 111–118.
  23. Ho JW et al. 2014 Comparative analysis of metazoan chromatin organization. *Nature* 512, 449– 452.
  24. Chiolo I, Minoda A, Colmenares SU, Polyzos A, Costes SV, Karpen GH. 2011 Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 144, 732 – 744. (doi:10.1016/j.cell.2011.02.012)
  25. Ryu T, Spatola B, Delabaere L, Bowlin K, Hopp H, Kunitake R, Karpen GH, Chiolo I. 2015
  26. Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nat. Cell Biol.* 17, 1401– 1411.
  27. Peng JC, Karpen GH. 2007 H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat. Cell Biol.* 9, 25 – 35.
  28. Jakob B, Splinter J, Conrad S, Voss KO, Zink D, Durante M, Lobrich M, Taucher-Scholz G. 2011 DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair

- protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.* 39, 6489 – 6499.
29. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T. 2003 Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299, 721 – 725.
  30. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA. 2008 ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* 31, 167 – 177.
  31. Tsouroula K, Furst A, Rogier M, Heyer V, Maglott-Roth A, Ferrand A, Reina-San-Martin B, Soutoglou E. 2016 Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin. *Mol. Cell* 63,
  32. Ryu T, Spatola B, Delabaere L, Bowlin K, Hopp H, Kunitake R, Karpen GH, Chiolo I. 2015 Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nat. Cell Biol.* 17, 1401– 1411.
  33. Ryu T, Bonner MR, Chiolo I. 2016 Cervantes and Quijote protect heterochromatin from aberrant recombination and lead the way to the nuclear periphery. *Nucleus* 7, 485– 497.
  34. Janssen A, Breuer GA, Brinkman EK, van der Meulen AI, Borden SV, van Steensel B, Bindra RS, LaRocque JR, Karpen GH. 2016 A single double-strand break system reveals repair dynamics and mechanisms in heterochromatin and euchromatin. *Genes Dev.* 30, 1645– 1657.
  35. Burgess RC, Burman B, Kruhlak MJ, Misteli T. 2014 Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep.* 9, 1703 – 1717.
  36. Gunjan A, Verreault A. 2003 A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* 115, 537– 549.
  37. Xuan Li and Wolf-Dietrich Heyer, Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance, 2011
  38. Wold MS. Replication protein A: heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:61–92.
  39. Sung P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science.* 1994;265:1241–1243.
  40. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition., New York: Garland Science; 2002, Βασικές Αρχές κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στην μοριακή βιολογία του κυττάρου.
  41. Πανεπιστήμιο Κρήτης με θέμα «Επιδιόρθωση βλαβών του DNA» [<http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL412/documents/Lecture6.pdf>]

## Κεφάλαιο 5: Μέθοδος Ανίχνευσης Ομαδοποιημένων Βλαβών

Η ανίχνευση των βλαβών του DNA είναι ένα σύνθετο αναλυτικό πρόβλημα, λόγω της χαμηλής τους συγκέντρωσης σε σχέση με το σύνολο του γονιδιώματος (λιγότερο από μία αλλοίωση ανά 1.000.000 φυσιολογικές βάσεις). Επιπλέον, όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού. Γι' αυτόν το λόγο, έχουν αναπτυχθεί δύο ειδών προσεγγίσεις αναφορικά με την ανίχνευση των βλαβών, οι άμεσες και οι έμμεσες [1].

Οι άμεσες μέθοδοι βασίζονται στην αναλυτική χημεία και απαιτούν την μελέτη συγκεκριμένων δειγμάτων στα οποία μετράται συγκεκριμένη βλάβη σε επίπεδο νουκλεοτιδίου, με χρήση συγκεκριμένου ανιχνευτή σε συνδυασμό με χρωματογραφικό διαχωρισμό.

Οι έμμεσες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί προσανατολίζονται κυρίως στη μέτρηση θραύσεων. Χρησιμοποιώντας ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA ή ειδικά αντισώματα ενάντια στις θραύσεις, είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθούν πολλές μεταβολές στο γονιδίωμα. Επίσης, στις έμμεσες μεθόδους συγκαταλέγονται και οι μέθοδοι κατά τις οποίες μετράμε τα βιολογικά αποτελέσματα των βλαβών, όπως οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

### Άμεσες Μέθοδοι

Η αρχή της μεθόδου της άμεσης ανίχνευσης βλαβών στο DNA αφορά στην εξαγωγή του γενομικού DNA και την υδρόλυσή του σε μονομερή, είτε νουκλεοτίδια ή βάσεις [2]. Έπειτα, χρησιμοποιούνται αναλυτικές μέθοδοι για τον διαχωρισμό των υδρολυμένων προϊόντων και συγκεκριμένες μέθοδοι ανίχνευσης για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των βλαβών. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ηλεκτροχημικής ανίχνευσης (HPLC-ECD) ήταν από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της 8-oxodGuo [3]. Η συγκεκριμένη βλάβη έχει μικρότερη ενέργεια ιονισμού σε σύγκριση με τις φυσιολογικές βάσεις και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά και επιλεκτικά. Ανάλογες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και για άλλες συγκεκριμένες βλάβες όπως π.χ. η 5-υδροξυ-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-HO-dCyd) και η 8-oxodAdo. Παράλληλα, με τη χρήση ενός ανιχνευτή UV μετρώνται οι φυσιολογικές βάσεις και τα αποτελέσματα μπορούν να αναχθούν σε αριθμό μεταβολών ανά αριθμό φυσιολογικών νουκλεοτιδίων. Σήμερα χρησιμοποιείται η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη -μέσω ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού- με φασματογραφία μάζας σε σειρά, η HPLC-MS/MS [2], που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη.

## Έμμεσες Μέθοδοι

Οι πρώτες απόπειρες έμμεσων μεθόδων στην ανίχνευση βλαβών του γενετικού υλικού έγιναν με τη χρήση αντισωμάτων. Αναπτύχθηκαν συγκεκριμένα αντισώματα ενάντια στα διμερή της πυριμιδίνης, τα οποία ήταν ιδιαίτερα ακριβή στον εντοπισμό των συγκεκριμένων βλαβών που προκαλούνται κυρίως από την ακτινοβολία UV[4]. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι αρκετά ακριβής για τον εντοπισμό οξειδωτικών βλαβών.[5]. Άλλες έμμεσες μέθοδοι αφορούν στον εντοπισμό των βλαβών του DNA και μεταξύ αυτών η μέθοδος αλκαλικής έκλουσης (alkaline elusion - AE) και η Τεχνική του Κομήτη (Commet Assay) είναι από τις πιο ακριβείς [6,7] και βασίζονται στο ότι ο αλκαλικός διαχωρισμός του DNA είναι πιο ταχύς σε περίπτωση που υπάρχουν θραύσεις (κυρίως μονόκλωνες). Η δυνατότητα αυτών των μεθόδων αυξάνεται ακόμη περισσότερο αν συνδυαστεί με ένζυμα επιδιόρθωσης τα οποία δημιουργούν θραύσεις στα σημεία των βλαβών πριν την ηλεκτροφόρηση ή την έκλουση. Στην ηλεκτροφόρηση υπό αλκαλικές συνθήκες, λόγω της προκαλούμενης αποδιάταξης, όλες οι βλάβες γίνονται ορατές, αλλά υπό αυτές τις συνθήκες δεν είναι δυνατό να διακριθούν οι ΔΚΘ από τις ΜΚΘ. Οι βλάβες εκτός των θραύσεων γίνονται ορατές, μέσω των ενζύμων που μετέτρεψαν τις πχ οξειδωτικές βλάβες σε θραύσεις. Αντίθετα, ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερες συνθήκες (οι οποίες δεν οδηγούν στην αποδιάταξη του μορίου) μπορεί να αποδώσει τις ΔΚΘ [8,9]. Μετρώντας διάφορες μορφές βλαβών, έγιναν προσπάθειες για τον προσδιορισμό της σχετικής σημασίας των άμεσων συγκριτικά με τις έμμεσες βλάβες [10] (όπως περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο), μετρώντας την αναλογία των βλαβών που προκλήθηκαν από οξείδωση μέσω ενός ηλεκτρονίου σε σύγκριση με αυτές που προκλήθηκαν από ρίζες υδροξυλίου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν πως το σημαντικότερο ρόλο στις βλάβες έχουν οι ρίζες υδροξυλίου και άρα ο έμμεσος μηχανισμός [11].

## 5.1 Μέθοδοι ανίχνευσης ομαδοποιημένων βλαβών

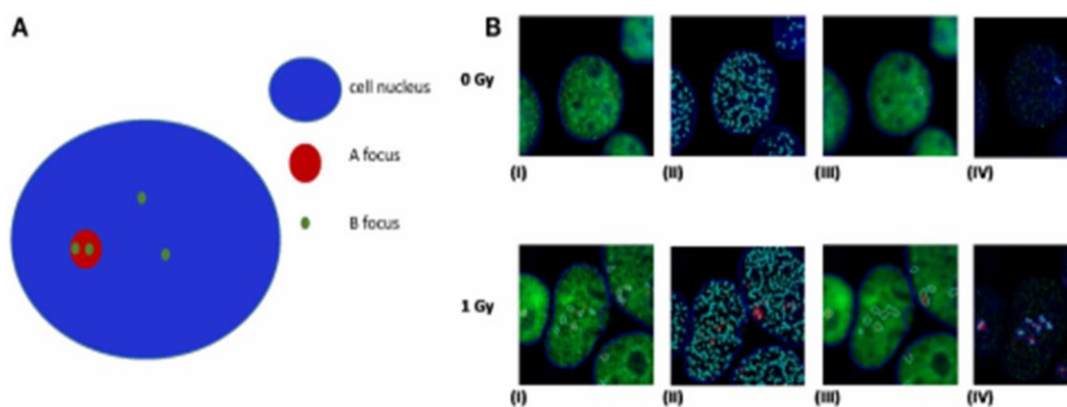
Οι μεθοδολογίες ανίχνευσης ομαδοποιημένων βλαβών είναι σχετικά περιορισμένες (ειδικά για τις μη-ΔΚΘ ομαδοποιημένες οξειδωτικές βλάβες) και προσανατολίζονται στο μηχανισμό απόκρισης βλάβης (DDR) ο οποίος ενεργοποιείται ως απόκριση στη δημιουργία των βλαβών. Πράγματι, έπειτα από τη δημιουργία μιας ΔΚΘ, η πρωτεΐνη ATM (κινάση σερίνης-θρεονίνης) φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2AX που βρίσκεται κοντά στη ΔΚΘ και μέσω αυτής της φωσφορυλίωσης δίνει "σήμα" στους μηχανισμούς του κυττάρου να εκκινήσουν την επιδιόρθωση του DNA[12]. Αυτές οι εστίες μπορούν να παρατηρηθούν και να μετρηθούν με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Από τις πιο αξιόπιστες ποσοτικές μεθόδους μέτρησης των ομαδοποιημένων βλαβών είναι και οι μέθοδοι ηλεκτροφόρησης, όπως η Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) και οι διάφορες παραλλαγές της σε συνδυασμό με τη χρήση επιδιορθωτικών ενζύμων, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι Sutherland et al. [13] κατάφεραν να μετρήσουν με μεγάλη ακρίβεια διαφορετικούς τύπους ομαδοποιημένων βλαβών με τη χρήση μη αποδομητικής ηλεκτροφόρησης. Εστιάζοντας στις ΔΚΘ, παρατηρείται πως τα ένζυμα επιδιορθωσης (όπως οι γλυκοζυλάσες και οι ενδονουκλεάσες) τις εντοπίζουν και προχωρούν σε αποκοπή της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας στο αντίστοιχο σημείο, οδηγώντας σε μονόκλωνες ή δίκλωνες (στην περίπτωση ομαδοποιημένων βλαβών) θραύσεις. Αυτές οι επιπλέον δίκλωνες θραύσεις που πραγματοποιούνται *in vitro* κατά την πειραματική διαδικασία τονίζεται ότι είναι πρόσθετες και υπό αυτήν την έννοια διαφορετικές από εκείνες (τις άμεσες και τις έμμεσες) που δημιουργούνται απευθείας από την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να μετρηθούν με ικανοποιητική ακρίβεια οι ΔΚΘ, σε συνδυασμό με αριθμητική ανάλυση μέσου μήκους (Number Average Length Analysis- NALA) [14]. Μία σημαντική μεθοδολογική βελτίωση στην ανίχνευση ομαδοποιημένων βλαβών έγινε μέσω προσαρμογών στην ηλεκτροφορητική Τεχνική του Κομήτη, η οποία όμως υστερεί ως προς την PFGE λόγω της μη ποσοτικής της φύσης και συνεπώς της αδυναμίας που παρουσιάζει στη δυνατότητα του προσδιορισμού βλαβών ανά Gy. Άλλο ένα σημαντικό στοιχείο στην περίπτωση των ηλεκτροφορητικών μεθόδων είναι η προσεκτική επιλογή του πρωτοκόλλου ηλεκτροφόρησης ώστε να μην χαθούν μικρά τμήματα DNA, τα οποία είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην περίπτωση της ακτινοβολίας υψηλής-LET (Linear Energy Transfer), όπου αναμένεται μεγάλη πυκνότητα στις βλάβες.

Παράλληλα με τις ηλεκτροφορητικές μεθόδους, έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι ανοσοσήμανσης για την ανίχνευση τόσο των ΔΚΘ όσο και γενικά των λοιπών βλαβών. Κάποιες από αυτές τις τεχνικές περιλαμβάνουν την ανοσοϊστοχημεία (IHC), την ανοσοκυτοχημεία (ICC), τον ανοσοφθορισμό (IF), την κυτταρομετρία ροής, την ELISA και την ανοσοσύτρωση κατά Western (W. Blotting) και όλες χρησιμοποιούν κατάλληλα αντισώματα ώστε να ανιχνευθεί μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη που σχετίζεται με συγκεκριμένη βλάβη στο DNA. Μία γενική περιγραφή του αντισώματος θα μπορούσε να το περιγράψει ως μια πρωτεΐνη σχήματος Υ, όπου το επάνω μέρος της είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του αντιγόνου (της πρωτεΐνης για την οποία έχει εξειδικευτεί το αντίσωμα) και ονομάζεται περιοχή αναγνώρισης, ενώ το κατώτερο τμήμα (η ουρά του Υ) έχει λειτουργικό ρόλο.

Όπως προαναφέρθηκε, μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη επιδιορθωσης είναι η ιστόνη H2AX η οποία κοντά σε ΔΚΘ μετατρέπεται στη φωσφορυλιωμένη της μορφή, γH2AX και έπειτα από ανοσοφθορισμό μπορούν να παρατηρηθούν με μικροσκόπιο φθορισμού. Η μέθοδος φθορισμού των εστιών της γH2AX είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική αφού έχει επαληθευθεί μία γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των εστιών γH2AX και της δόσης ακτινοβολίας και αντίστοιχα υπάρχει σχέση 1:1 ανάμεσα σε αυτές τις εστίες και τις ΔΚΘ. Λόγω της μεγάλης σημασίας αυτών των εστιών στην ανίχνευση των ΔΚΘ,

μελέτες εστίασαν στον πιθανό εντοπισμό θέσεων συνεντοπισμού (colocalization) και άλλου τύπου πρωτεϊνών επιδιόρθωσης με τις  $\gamma$ H2AX. Μία πρόσφατη μελέτη των Asaithamby et al. [15] εστίασε στον εντοπισμό τέτοιων θέσεων με διαφορετική χρώση των διαφορετικών πρωτεϊνών απόκρισης βλάβης που βρίσκονται στην ίδια κυτταρική περιοχή. Για παράδειγμα, με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών όπως θα δοθεί στα επόμενα κεφάλαια, μπορεί κανείς να μετρήσει τον συνεντοπισμό των πρωτεϊνών APE1 και  $\gamma$ H2AX σε κύτταρα HepG2 τα οποία έχουν ακτινοβοληθεί με ιόντα Αργού (Ar-36, LET 269.4keV/ $\mu$ m), όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα Θ5-1**, όπου παρατηρείται πως η  $\gamma$ H2AX δίνει σαφώς ορισμένες μεγάλες περιοχές ενώ η APE1 δίνει στιγματώδη και διάχυτη χρώση, ορίζοντας πολλές μικρές εστίες ακόμα και σε κύτταρα που δεν έχουν ακτινοβοληθεί.



**Εικόνα Θ5-1:** Απεικόνιση συνεντοπισμού πρωτεϊνών APE1 και  $\gamma$ H2AX έπειτα από ακτινοβολήση. Πηγή: Τροποποίηση από Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG and Ravanat J-L (2015) *Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. Front. Chem.* 3:35.

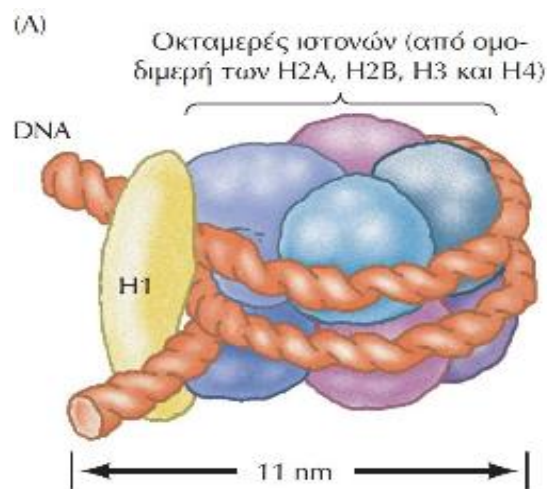
Η διαφορά στη χρώση έγκειται στο γεγονός πως ενώ η  $\gamma$ H2AX εμφανίζεται μόνο στην περίπτωση της ΔΚΘ, η APE1 προϋπάρχει στο κύτταρο και σε περίπτωση ΔΚΘ συγκεντρώνεται στο σημείο της βλάβης. Παρόλα αυτά, υπάρχει ένα μειονέκτημα σε αυτή την τεχνική, καθώς δεν μπορεί να διαχωριστεί ο φθορισμός κάθε μορίου ξεχωριστά, είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθεί η σχέση που συνδέει την APE1 ή άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με μη-ΔΚΘ (πχ την OGG1 που σχετίζεται με αβασικά σημεία) με τον αριθμό των βλαβών

## 5.2 Η ιστόνη H2A

Το DNA στον πυρήνα αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες για την καλύτερη οργάνωσή του και τον έλεγχο της μεταγραφής του. Οι πρωτεΐνες του πυρήνα χωρίζονται σε: 1. Χρωμοσωμικές πρωτεΐνες μη-ιστόνες: Βρίσκονται στη χρωματίνη μαζί με τις ιστόνες,

δεν είναι δομικές πρωτεΐνες, αλλά είναι κυρίως λειτουργικές. 2. Ιστόνες: είναι πρωτεΐνες με μοριακό μέγεθος 10-20 kDa, είναι πλούσιες σε αμινοξέα αργινίνης και λυσίνης (βασικά αμινοξέα) και είναι το κυρίαρχο πρωτεϊνικό συστατικό της χρωματίνης. Δεσμεύονται με το DNA φτιάχνοντας νουκλεοπρωτεϊνικά ινίδια.

Τέσσερις πρωτεΐνες ιστόνης, H2A, H2B, H3 και H4, καθεμία από τις οποίες μοιράζεται το μοτίβο αναδίπλωσης της ιστόνης και υπάρχει σε δύο αντίγραφα, σχηματίζει το οκταμερές ιστόνης και συμπύκνωση το DNA μέσω της περιτύλιξης περίπου κατά 3 φορές. Για τη συναρμολόγηση νουκλεοσωμάτων, το DNA αρχικά περιτυλίσσεται γύρω από το τετραμερές H3-H4 πριν την προσθήκη δύο διμερών H2A-H2B τα οποία συμπληρώνουν τον πυρήνα [13], **Εικόνα Θ5-2**.



*Εικόνα Θ5-2: Το πυρηνικό σωματίο του νουκλεοσώματος αντιστοιχεί σε ένα τμήμα 147 bp DNA τυλιγμένο κατά 1,67 στροφές γύρω από το οκταμερές των ιστονών, δηλαδή γύρω από έναν πυρήνα που αποτελείται από ομοδιμερή των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4. Ένα χρωμόσωμα περιέχει δύο πλήρεις στροφές DNA (166 bp) που σφραγίζονται από ένα μόριο H1. Πηγή: Πανεπιστήμιο Πάτρας, Χημικό, στο πλαίσιο της παρουσίασης «Η οργάνωση και οι αλληλουχίες των κυτταρικών γονιδιωμάτων», 2011*

### 5.3 Η φωσφορυλίωση της ιστόνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι ΔΚΘ μπορούν να προκληθούν από μηχανισμούς όπως η ιοντίζουσα ακτινοβολία ή άλλους κυτταροτοξικούς παράγοντες. Όταν η βλάβη του DNA, είτε είναι ενδογενής είτε εξωγενής, σχηματίζει ΔΚΘ, ακολουθεί πάντα η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX.

Με τη συγκέντρωση σηματοδοτικών μορίων σε θέσεις βλάβης, η γH2AX ενισχύει το σήμα βλάβης του DNA. Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη, γH2AX, είναι το πρώτο βήμα



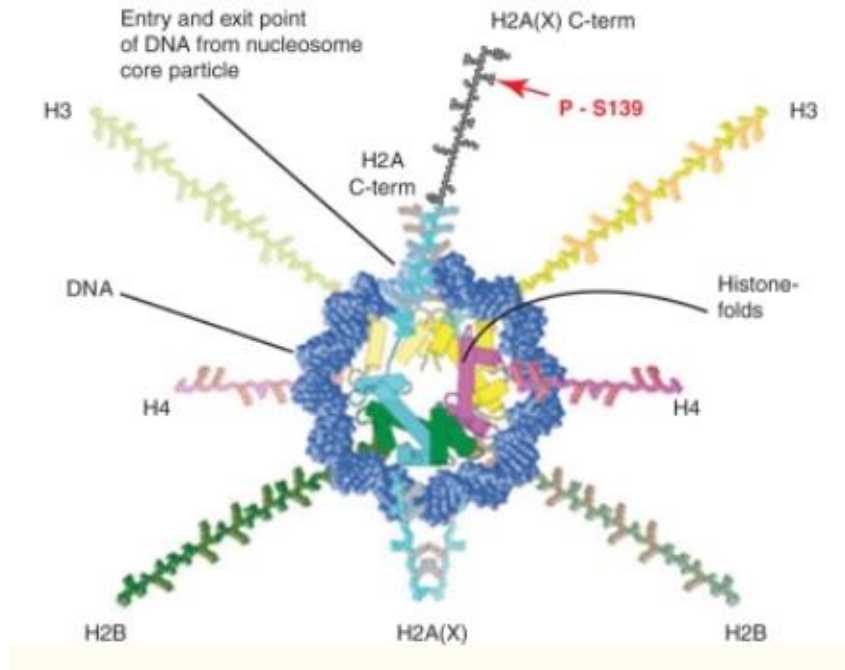
στην πρόσληψη και εντοπισμό πρωτεϊνών επιδιόρθωσης DNA. Ακόμα, η φωσφορυλίωση της H2AX βοηθά στην πρόσδεση των χρωμοσωμικών άκρων μαζί, μειώνοντας τις πιθανότητες των ΔΚΘ να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμβάντα αντιγραφής [4]. Ο σχηματισμός γH2AX ξεκινά μέσα σε δευτερόλεπτα μετά την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία και διέρχεται ταχέως μέσω μίας μισής μέγιστης τιμής σε 1 λεπτό σε μέγιστη τιμή στα 9-30 λεπτά [5]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση των ιστονών H2AX δεν περιορίζεται στην άμεση γειτνίαση, αλλά εξαπλώνεται αντ' αυτού σε μια μεγάλη περιοχή χρωματίνης που περιβάλλει τη ΔΚΘ. Έρευνα έχει δείξει πως το 0,03-0,06% των μορίων H2AX/ δίκλωνη θραύση φωσφορυλιώνονται και κατανέμονται σε περιοχές 2 Mbp χρωματίνης που καλύπτουν περίπου 2000 μόρια γH2AX [5]. Ωστόσο, φωσφορυλίωση στην H2AX μπορεί να συμβεί έως και σε 30Mbp μακριά από τη θραύση.[10],[13]

### 5.3.1 Η Φύση

Η H2AX (ή H2AFX<sup>14</sup>) είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών H2A, η οποία είναι ένα συστατικό του οκταμερούς ιστονών στα νουκλεοσώματα [8]. Το μέλος H2AX απαντάται στα θηλαστικά σε ποσοστό 2-25% σε σχέση με την H2A. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει στη θέση τής σερίνης 139, η οποία βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο τής H2AX, όπως ακριβώς φαίνεται στην **Εικόνα Θ5-3**

---

<sup>14</sup>H2AFX:H2A Family memberX



Εικόνα Θ5-3: Μοντέλο του πυρηνικού σωματίου του νουκλεοσώματος. Απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του DNA και ιστονών του πυρήνα. Τα σημεία εισόδου και εξόδου εντοπίζονται στο διμερές H2A/H2B. Το C-άκρο της H2AX εμφανίζεται με μαύρο χρώμα και ένα κόκκινο βέλος το οποίο δείχνει τη φωσφορυλίωση με SQEY μοτίβο. Πηγή: “ $\gamma$ H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin”, Andrea Kinner, Wenqi Wu, Christian Staudt, and George Iliakis\*

Οι ATM, DNA-PK και ATR, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων \*PIKKs φωσφορυλιώνουν την H2AX [3]. Η ATM και DNA-PK φωσφορυλιώνουν την H2AX με την επαγωγή ΔΚΘ, στις φάσεις G1 και G2 του κυτταρικού κύκλου, ενώ η ATR είναι υπεύθυνη για το στρες διπλασιασμού και τη βλάβη που προκαλείται από τη UV στη φάση S. Μεταξύ αυτών των κινάσων PIKK, η ATM φαίνεται καταλληλότερη για τη φωσφορυλίωση της H2AX, λόγω της ικανότητάς της να ενεργοποιείται άμεσα, από τις τοπικές τροποποιήσεις χρωματίνης που συνδέονται με θραύση του DNA [14]. Εφόσον η τροποποίηση της χρωματίνης περιλαμβάνει ολόκληρες περιοχές χρωματίνης, η ATM είναι ικανή να φωσφορυλιώνει αρκετά μόρια H2AX εντός αυτής της περιοχής και φαίνεται πως είναι η κύρια κινάση που σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση H2AX υπό φυσιολογικές συνθήκες [13]. Η ATR, ανιχνεύοντας τις ΔΚΘ που σχετίζονται με το στρες αντιγραφής του DNA και τη βλάβη που προκαλείται από UV, ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει την H2AX. Επισημαίνεται, ότι καθώς η ATR ενεργοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με την ATRIP, η οποία αναγνωρίζει μονόκλωνες περιοχές στο DNA, η φωσφορυλίωση της H2AX που διαμεσολαβείται από την ATR δεν αντανακλά απαραίτητα την παρουσία μιας ΔΚΘ στο γονιδίωμα.

### 5.3.2 Σκοπός της φωσφορυλίωσης

Τα πρώιμα γεγονότα στην κυτταρική απόκριση σε βλάβες του DNA, βασίζονται στην αναγνώριση των αλλοιώσεων και στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας [6]. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX μπορεί να θεωρηθεί ότι οριοθετεί συγκεκριμένες λειτουργίες σε συγκεκριμένα τμήματα της χρωματίνης. Άλλες τέτοιες τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9 και της λυσίνης της ιστόνης H4, που είναι χαρακτηριστικές της συστατικής ετεροχρωματίνης [4]. Δεδομένου ότι, η ετεροχρωματίνη και η ευχρωματίνη αντιπροσωπεύουν διαφορετικά περιβάλλοντα χρωματίνης, είναι πιθανό να υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία τους σε βλάβη DNA ή στην ανίχνευση και την επεξεργασία των ΔΚΘ.

Οι εστίες γH2AX χωρίζονται στις παροδικές και στις παραμένουσες. Οι παροδικές, οι οποίες αποτελούν περίπου το 80%, οπτικοποιούν ΔΚΘ οι οποίες επιδιορθώνονται γρήγορα από τον NHEJ, ενώ οι παραμένουσες, περίπου 20%, μπορεί να μείνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μέχρι και μήνες. Καθώς επιδιορθώνονται οι ΔΚΘ, ο αριθμός των φωσφορυλιωμένων H2AX μειώνεται με το χρόνο. Η αποφωσφορυλίωσή τους γίνεται με τέσσερις φωσφατάσες σερίνης / θρεονίνης σε ανθρώπινα κύτταρα: PP2A, PP4, PP6 και PP2C.

## 5.4 Οι Εφαρμογές της ανίχνευσης εστιών γH2AX

- Ένα αντίσωμα μπορεί να αναπτυχθεί έναντι της γH2AX το οποίο μπορεί επομένως να εμφανιστεί με ανοσοφθορισμό μέσω δευτερογενών αντισωμάτων. Η ανίχνευση και της γH2AX με κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την αξιολόγηση της βλάβης του DNA και της επιδιόρθωσης του DNA.
- Η γH2AX έχει επίσης άλλες εφαρμογές στην ανίχνευση γονιδιακών βλαβών που προκαλούνται από κυτταροτοξικούς χημικούς παράγοντες και περιβαλλοντικές και φυσικές βλάβες, ειδικά στο πλαίσιο θεραπείας του καρκίνου.
- Η ανάλυση και η πρόβλεψη της ραδιοευαισθησίας του κυττάρου στη θανάτωση αποτελεί επίσης μία σημαντική εφαρμογή. Μπορεί να βρει εφαρμογή στην κλινική, κατά τη διάρκεια της θεραπείας ανθρώπινων όγκων με ιοντίζουσα ακτινοβολία, στην αξιολόγηση των διακυμάνσεων της ραδιοευαισθησίας και ακόμη και στην πρόβλεψη της δόσης σε πυρηνικά ατυχήματα ή τρομοκρατικές επιθέσεις που αφορούν ραδιενεργά υλικά.

## 5.5 Οι Βιοδείκτες

Βιοδείκτης καλείται ένα μετρήσιμο σήμα κάποιας βιολογικής κατάστασης –ασθένειας και ο ρόλος του στην ιατρική είναι η κατανόηση της μοριακή βάσης της ασθένειας, της διάγνωσης και της θεραπείας της. Ένας ιδανικός βιοδείκτης είναι εύκολα μετρήσιμος και απολύτως ειδικός για μία συγκεκριμένη νόσο. Η ποσότητα θα πρέπει να αντανακλά τη σοβαρότητα της νόσου και η δυνατότητα μέτρησης μικρών ποσοτήτων να επιτρέπει την πρόωπη διάγνωσή της. Ακόμα ο ιδανικός δείκτης δεν επηρεάζεται από άλλες βιολογικές διαταραχές. Οι βιοδείκτες επιτρέπουν α) την παρακολούθηση ασθενειών με μεγαλύτερη ακρίβεια, β) την έγκαιρη έναρξη θεραπευτικής αγωγής και την καλύτερη φροντίδα των ασθενών με τον καθορισμό της πλέον κατάλληλης θεραπείας, γ) τη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας του πληθυσμού [15,16].

Οι δείκτες μπορεί να βρίσκονται στο αίμα (κύτταρα, πρωτεΐνες, DNA, mRNA μετάγραφα), στους ιστούς και στις εκκρίσεις. Ανιχνεύονται με τη μέθοδο ELISA στο αίμα, με ανοσοϊστοχημεία στους ιστούς, με γενετικές μεθόδους και με PET (μεταβολική απεικόνιση). Συγκεκριμένα, οι καρκινικοί βιοδείκτες είναι ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα όγκων ή τον οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία όγκων.

Στην ιατρική, ένας βιοδείκτης μπορεί να είναι μια ανιχνεύσιμη ουσία που εισάγεται σε έναν οργανισμό ως μέσο για την εξέταση της λειτουργίας οργάνων ή άλλων πτυχών της υγείας. Μπορεί επίσης να είναι μια ουσία της οποίας η ανίχνευση υποδεικνύει μια συγκεκριμένη κατάσταση νόσου, για παράδειγμα, η παρουσία ενός αντισώματος μπορεί να υποδεικνύει μόλυνση. Ειδικότερα, ένας βιοδείκτης υποδεικνύει μια μεταβολή στην έκφραση ή την κατάσταση μιας πρωτεΐνης που συσχετίζεται με τον κίνδυνο, την πρόοδο μιας νόσου ή με την ευαισθησία της νόσου σε μια δεδομένη θεραπεία [15].

### 5.5.1 Η $\gamma$ H2AX ως βιοδείκτης

Καθώς η ιοντίζουσα ακτινοβολία εκπέμπεται σε ακριβείς ποσότητες και χρονικές περιόδους, οι επιπτώσεις της στα κύτταρα έχουν διερευνηθεί εντατικά ποιοτικά και ποσοτικά. Εάν η H2AX κατανέμεται τυχαία σε όλη τη χρωματίνη, τότε το κλάσμα της  $\gamma$ H2AX είναι ένα μέτρο του κλάσματος της χρωματίνης και επομένως του DNA που εμπλέκεται ανά Gy. Άρα, μια παρόμοια περιοχή της χρωματίνης εμπλέκεται ανά Gy ανεξάρτητα από την κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα, η ιοντίζουσα ακτινοβολία από το  $^{137}\text{Cs}$  έχει σαν αποτέλεσμα 35 ρήξεις δίκλωνων θραύσεων DNA/G1 γονιδίωμα που είναι  $6 \times 10^9$  bp DNA σε κύτταρα θηλαστικών. Αυτές οι παράμετροι μας επιτρέπουν να προσδιορίσουμε την κινητική και τη στοιχειομετρία του σχηματισμού  $\gamma$ H2AX [5]. Οι συγκεντρώσεις των εστιών μπορούν να παρατηρηθούν με μικροσκοπία φθορισμού[1]. Η έκφραση  $\gamma$ H2AX χρησιμοποιείται ευρέως ως ο πρώτος γνωστός δείκτης διάσπασης

χρωμοσωματικού DNA και συγκεκριμένα ως ένας ευαίσθητος δείκτης ΔΚΘ επαγόμενων από ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Αυξημένα επίπεδα εστιών  $\gamma\text{H2AX}$ , που προκαλούνται είτε από φάρμακα είτε από δόσεις ακτινοβολίας, σχετίζονται στενά με τον κυτταρικό θάνατο. [12] Αυτό σημαίνει ότι η μέτρηση των εστιών  $\gamma\text{H2AX}$  σε κύτταρα ασθενούς είναι ένας βιολογικά σημαντικός δείκτης ΔΚΘ, επομένως και τοξικότητας μετά από χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Δυστυχώς, η μεταβλητότητα της έκφρασης  $\text{H2AX}$  που σχετίζεται με διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών καθιστά δύσκολη την ερμηνεία της έννοιας του επιπέδου των εστιών  $\gamma\text{H2AX}$ . Επιπλέον, οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση  $\gamma\text{H2AX}$  εστιών βασίζονται σε μεθόδους μικροσκοπίας.

[17]

## 5.6 Οι Βασικές Μέθοδοι-Τεχνικές ανίχνευσης $\gamma\text{H2AX}$

### 5.6.1 Η Κυτταρομετρία ροής

Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό, μέσω της ανάλυσης της σκέδασης του φωτός από τα κύτταρα καθώς και της εκπομπής φθορισμού από αυτά. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης.

Η κυτταρομετρία ροής προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας ποσοτικοποίησης του επιπέδου  $\gamma\text{H2AX}$  σε μεγάλους πληθυσμούς κυττάρων και η ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων των κυτταρομετρικών δεδομένων καθιστά δυνατή τη συσχέτιση της βλάβης του DNA με άλλες ιδιότητες του κυττάρου, π.χ. φάση κυτταρικού κύκλου [19], αλλά έχει χαμηλή και περιορισμένη ευαισθησία [17,18]. Να σημειωθεί πως η κυτταρομετρία ροής μετρά μόνο συνολικό φθορισμό ενός κυττάρου και όχι αριθμό θραύσεων/εστιών φθορισμού.

### 5.6.2 Η Μέθοδος ELISA- $\gamma\text{H2AX}$

Όταν η προς ανίχνευση πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα διάλυμα, όπως για παράδειγμα ο ορός του αίματος, χρησιμοποιείται η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσορφητική μέτρηση (γνωστή εν συντομία ως ELISA -Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Η ELISA είναι μια βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Αρχικά, ένα αντίσωμα

προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια (Elisa sandwich), μετά προστίθεται το δείγμα μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο και γίνεται πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Κατόπιν, προστίθεται αντίσωμα που ανιχνεύει το αντιγόνο. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση με την χρήση ενός ενζύμου που δεσμεύεται έμμεσα με το σύμπλοκο. Έπειτα προστίθεται υπόστρωμα και γίνεται ενζυμική αντίδραση που δίνει έγχρωμο σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια μετρείται. Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του βιομορίου που μελετάται.[23]

Η υψηλή ευαισθησία της ELISA παρέχει την ευκαιρία να εκτιμηθούν τα συνολικά επίπεδα H2AX στα λύματα των κυττάρων και των ιστών, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί η κυτταρική περιεκτικότητα σε H2AX είναι ειδική για κύτταρα ή ιστούς και μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο φάσμα, κυμαινόμενη από 2 έως 25% του συνολικού H2A. Είναι ικανή να μετρά με ακρίβεια τις ΔΚΘ που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία ή τους παράγοντες που καταστρέφουν το DNA τόσο στα κύτταρα όσο και στους ιστούς. Έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει τη μελέτη της μεταλλαξιογένεσης και των οδών απόκρισης στις βλάβες του DNA στον καρκίνο. Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις που βασίζονται σε μικροσκόπια, η μέθοδος ELISA είναι ταχύτερη (μπορεί να πραγματοποιηθεί εντός μιας εργάσιμης ημέρας) και διαθέτει εσωτερικό έλεγχο (σύνολο H2AX) για αξιόπιστες μετρήσεις. Η συμπερίληψη μιας μέτρησης για το συνολικό H2AX βοηθά να διασφαλιστεί ότι τυχόν παρατηρούμενες αυξήσεις των επιπέδων γH2AX πράγματι οφείλονται σε βλάβη του DNA και δεν προκαλούνται από διαφορές στην έκφραση της αρχικής H2AX ή από παραποιήσεις στην προετοιμασία του δείγματος (δοκιμασίες για γH2AX μόνο).

Η γH2AX ELISA αντιπροσωπεύει μια νέα προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βλάβης του DNA, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση των μεταλλαξιογόνων οδών στον καρκίνο και να παράσχει ένα χρήσιμο βιοδείκτη για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών παραγόντων που καταστρέφουν το DNA. [17]

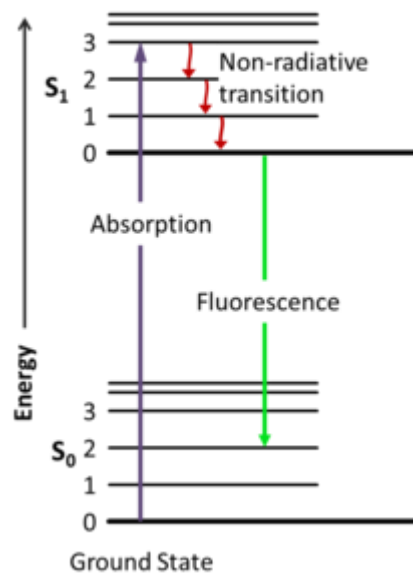
### 5.6.1 Ο *In situ* ανοσοφθορισμός

Ως φθορισμός ορίζεται η εκπομπή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από μία ουσία η οποία ακτινοβολείται από φως μικρότερου μήκους κύματος. Στον φθορισμό χρησιμοποιείται υπεριώδες φως (UV) το οποίο πέφτει πάνω στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος<sup>15</sup> (Εικόνα 05-4). Αυτά διεγείρονται και απελευθερώνουν την ενέργεια που προσέλαβαν με τη μορφή φωτονίων. Μέρος της αρχικής διεγείρουσας

---

<sup>15</sup> Το φθοριόχρωμα είναι μια οργανική ουσία που έχει την ιδιότητα να φθορίζει-ακτινοβολεί όταν διεγερθεί κατάλληλα.

ενέργειας καταναλώνεται και έτσι το φθοριόχρωμα εκπέμπει φως μικρότερης ενέργειας από τη διεγείρουσα ακτινοβολία.



Εικόνα Θ5-4: Περιγραφή του μηχανισμού φθορισμού. Στον φθορισμό χρησιμοποιείται υπεριώδες φως (UV) το οποίο πέφτει πάνω στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριόχρωματος. Αυτά διεγείρονται (ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην εξωτερική στιβάδα και στην συνέχεια επαναφέρονται στην αρχική) και απελευθερώνουν την ενέργεια που προσέλαβαν με τη μορφή φωτονίων. Μέρος της αρχικής διεγείρουσας ενέργειας καταναλώνεται και έτσι το φθοριόχρωμα εκπέμπει φως μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερο μήκος κύματος) από τη διεγείρουσα ακτινοβολία.

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και τον εντοπισμό αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα, τα οποία είναι προσκολλημένα πάνω σε ειδικά διαμορφωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μικροοργανισμών, αντισωμάτων έναντι μικροοργανισμών, φυσικών αντιγόνων, μικροοργανισμών και συμπληρώματος στους ιστούς και αυτοαντισωμάτων. Ο ανοσοφθορισμός διακρίνεται σε έμμεσο και άμεσο. Στο πείραμα που έχουμε επεξεργαστεί, η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι ο *in situ* έμμεσος ανοσοφθορισμός, όπου ανιχνεύονται αντισώματα ως προς το μελέτη δείγμα μέσω άλλων πρωτεϊνών. Το αντίσωμα αυτό γίνεται ορατό μέσω της μικροσκόπησης αφού φθορίζει και έτσι υποδεικνύει τις πρωτεΐνες που εξετάζονται και συμβάλλουν στην επιδιόρθωση του DNA. Επομένως, μαρτυρούν τις βλάβες που λαμβάνουν χώρα.

Η ποσοτικοποίηση της εστίας με βάση την μικροσκοπία φθορισμού είναι η πιο ευαίσθητη ανάλυση για τη μέτρηση των επιπέδων των ΔΚΘ, αλλά και η λιγότερο κατάλληλη για εφαρμογές υψηλής απόδοσης. Τα δείγματα ιστών πρέπει να προετοιμαστούν μεμονωμένα για μικροσκοπία φθορισμού και πρέπει να υποβληθούν

σε επεξεργασία εκατοντάδες ή χιλιάδες κύτταρα για να μετρηθούν οι εστίες  $\gamma\text{H2AX}$  ή για να μετρηθεί η ένταση του σήματος  $\gamma\text{H2AX}$ .

Σημαντική διαφορά μεταξύ της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού και της κυτταρομετρίας ροής είναι πως η πρώτη είναι πιο ευαίσθητη και επιτρέπει την ανάλυση περισσότερων μεταβλητών σχετικών με τη  $\gamma\text{H2AX}$ . Ακόμα, στην κυτταρομετρία ροής μπορεί να υπολογιστεί μόνο η ένταση του φθορισμού της  $\gamma\text{H2AX}$  και όχι το πλήθος των foci. Τέλος, η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού μπορεί να αναλύσει περισσότερους τύπους δειγμάτων σε σχέση με την κυτταρομετρία ροής, η οποία δεν μπορεί να αναλύσει ιστούς.

## 5.7 Η πρωτεΐνη TP53BP1

Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται από μηνύματα που προκαλούν κυτταρικό stress και κατ' επέκταση συμμετέχει στη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας μετά τη βλάβη. Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί στην αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων, καθώς και σε μία ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, όπως είναι η ανασχεση του κυτταρικού κύκλου, η γήρανση, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Η απόπτωση εξαρτάται από ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς παράγοντες, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η 53BP1 είναι μια πρωτεΐνη σύνδεσης με τη p53. Η πρωτεϊνική κινάση ATM ανιχνεύει τις αλλοιώσεις του DNA, ενεργοποιεί παράγοντες επιδιόρθωσης και αναστέλλει την πορεία του κυτταρικού κύκλου. Ακόμα, η 53BP1 παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή του μονοπατιού επιδιόρθωσης στην αρχική απόκριση της βλάβης του DNA.

Σύμφωνα με τους Irene Rappold et al [20], η 53BP1 υπερφωσφορυλιώνεται και μετατοπίζεται γρήγορα στις θέσεις των θραύσεων του DNA μετά την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία και συσσωματώνεται ταχέως με τη  $\gamma\text{H2AX}$  σε απόκριση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία, όπως θα εξεταστεί στα επόμενα, στο υπολογιστικό μέρος της εργασίας.

## 5.8 Η παράμετρος εκτίμησης συνεντοπισμού Pcolc

Προκειμένου να μελετηθούν οι ΔΚΘ και ο συνεντοπισμός μεταξύ των πρωτεϊνών, μέσω της ανάλυσης των εικόνων φθορισμού, έχει οριστεί μία παράμετρος, η Pcolc (colocalization parameter) [21,22]. Η παράμετρος αυτή συγκρίνει την επιφανειακή φωτεινότητα του σήματος από την επισημασμένη πρωτεΐνη επιδιόρθωσης των βλαβών



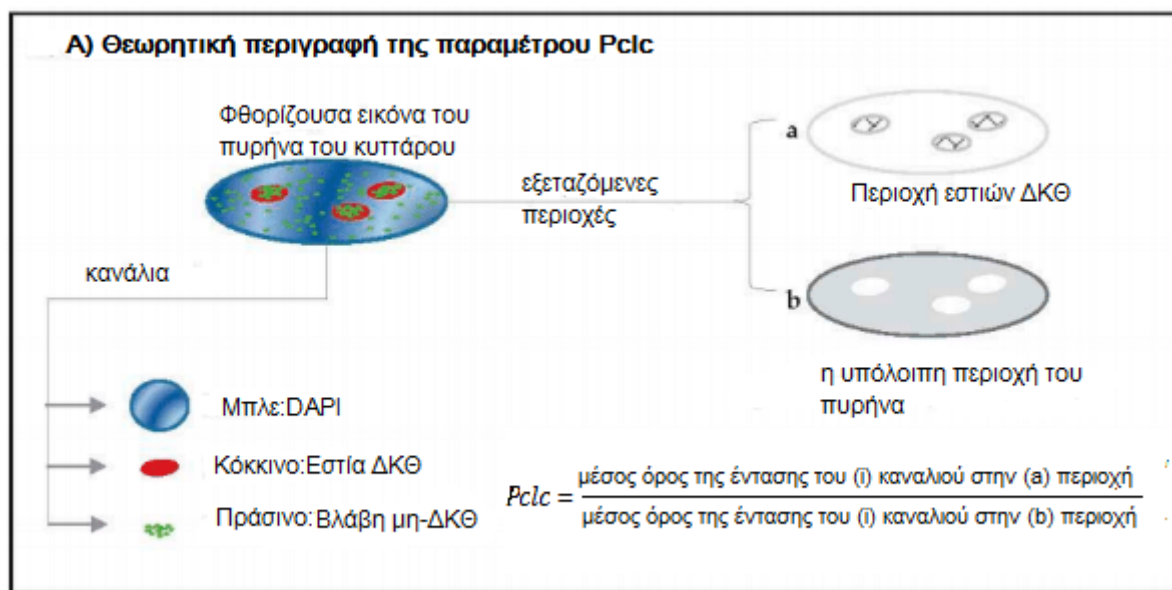
βάσεων, η οποία είναι ορισμένη στις εστίες φθορισμού των ΔΚΘ με το ίδιο μέγεθος ορισμένο στον υπόλοιπο πυρήνα του κυττάρου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, σύμφωνα με τη διδακτορική διατριβή της Ζ.Νικητάκη, μέλους του εργαστηρίου μας, για την εκτίμηση του συνεντοπισμού χρησιμοποιούμε το κριτήριο-παράμετρο  $Pclc$  που ορίζεται ως ο λόγος:

$$Pclc = \frac{M.O \text{ (μέσης έντασης στοπράσινο για την κόκκινηεστία}_i)}{\frac{\text{ολική ένταση στο πράσινο όλου του πυρήνα} - \sum_i \text{ολική ένταση στο πράσινο για την κόκκινη εστία}_i}{\text{όγκος του πυρήνα} - \sum_i \text{όγκος της κόκκινης εστίας}_i}}$$

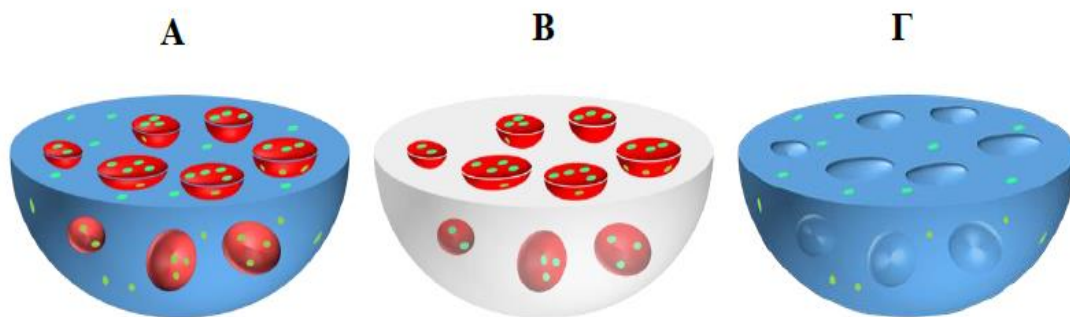
Αρχικά, το  $Pclc$  αναφέρεται σε ένα κύτταρο, και όχι σε ολόκληρη εικόνα και ο δείκτης  $i$  αναφέρεται σε κάθε εστία ΔΚΘ. Ο υπόλοιπος πυρήνας κυττάρου ορίζεται ως ο όγκος του πυρήνα, εξαιρουμένου του όγκου που καταλαμβάνεται από τις εστίες ΔΚΘ,  
**Εικόνα Θ5-5.** Αναλυτικά, το  $Pclc$  εκφράζει:

$$Pclc = \frac{M.O \text{ της μέσης έντασης που εκδηλώνει κάθε εστία ΔΚΘ στο κανάλι των βλαβών βάσεων}}{\text{μέση ένταση του υπόλοιπου του πυρήνα στο κανάλι του χρώματος των βλαβών βάσεων}}$$



Εικόνα Θ5-5: Απεικόνιση μίας φθορίζουσα εικόνας του πυρήνα του κυττάρου για τη θεωρητική περιγραφή της παραμέτρου  $Pclc$ . Πηγή: *Complex DNA Damage: A Route to Radiation- Induced Genomic Instability and Carcinogenesis*

Η εικόνα του πυρήνα του κυττάρου, **Εικόνα Θ5-6**, δίνεται και σε τύπου τρισδιάσταση για να γίνει αντιληπτός ο εξεταζόμενος όγκος.

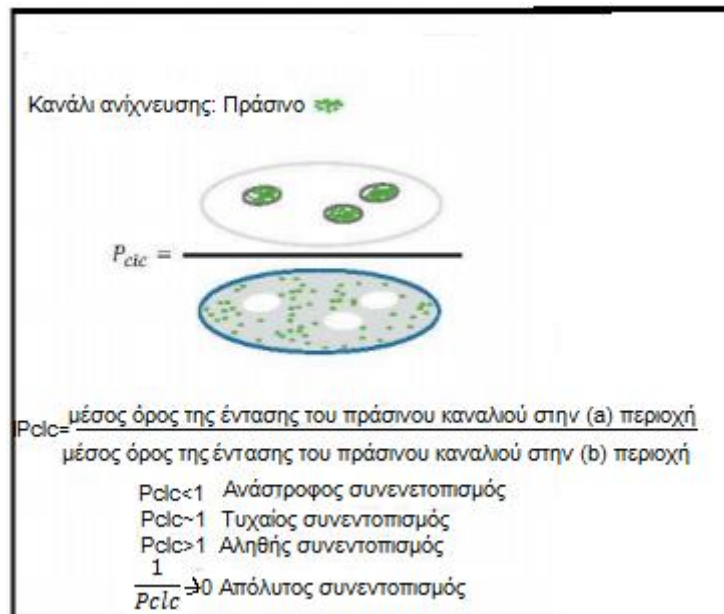


Εικόνα Θ5-6:3. Στο μέρος Α) παρουσιάζεται ολόκληρος ο πυρήνας του κυττάρου, με μπλε χρώμα, όπου επίσης υπάρχουν οι μεγάλες (κόκκινες εδώ) εστίες που αντιπροσωπεύουν τις ΔΚΘ και οι μικρές (πράσινες εδώ) εστίες που αντιπροσωπεύουν βλάβες βάσεων. Στο μέρος Β) ο θεωρούμενος χώρος είναι μόνο ο χώρος των μεγάλων (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. Πηγή: Διδακτορική Διατριβή Ζ.Νικητάκη «Επιδιόρθωση οξειδωτικών ομαδοποιημένων βλαβών DNA ύστερα από έκθεση καρκινικών κυττάρων σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες».

Οι εστίες μπορεί να είναι ανόμοιου μεγέθους, μικρές και με διάσπαρτη χρώση.

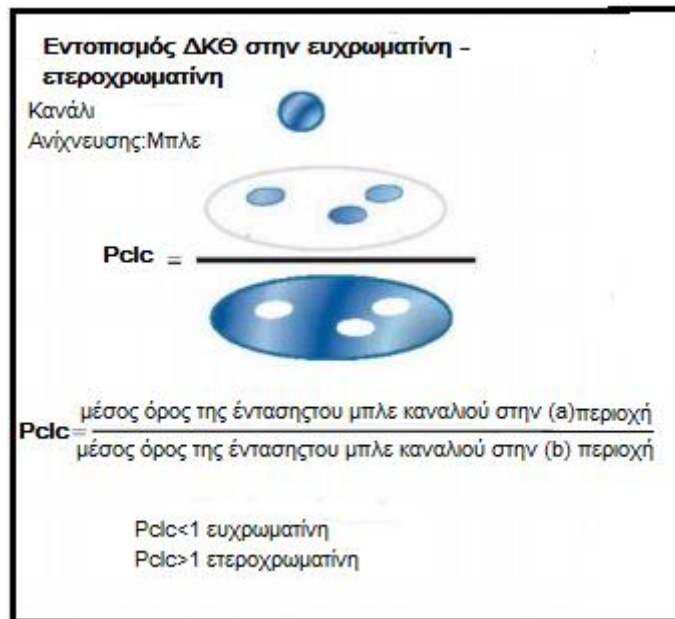
Όταν οι τιμές της  $P_{dc}$  είναι μικρότερες της μονάδας, εκφράζουν ανάστροφο συσπεντοπισμό. Όταν τείνουν στην τιμή 1 εκφράζουν τυχαίο συσπεντοπισμό, ενώ όταν είναι πολύ μεγαλύτερες του 1, εκφράζουν αληθή συσπεντοπισμό. **Εικόνα Θ5-7.**

Αυτό είναι ένα πλεονέκτημα για την παράμετρο αυτή καθώς μπορείς να αποφανθείς άμεσα για το αν είναι τυχαίος ή όχι ο συσπεντοπισμός.



Εικόνα Θ5-7: Το  $P_{cic}$ , έχοντας ως κανάλι ανίχνευσης το πράσινο, ορίζεται ως ο λόγος του μέσου όρου της έντασης του πράσινου καναλιού στην περιοχή α, προς το μέσο όρο της έντασης του ίδιου καναλιού στην περιοχή β. Όταν οι τιμές της  $P_{cic}$  είναι μικρότερες της μονάδας, εκφράζουν ανάστροφο συνεντοπισμό, όταν τείνουν στην τιμή 1 εκφράζουν τυχαίο συνεντοπισμό, όταν είναι πολύ μεγαλύτερες του 1, εκφράζουν αληθή συνεντοπισμό, ενώ όταν ο λόγος  $1/P_{cic}$  τείνει στο 0 εκφράζουν απόλυτο συνεντοπισμό. Πηγή: *Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis*

Στην παρούσα διπλωματική, στο Β' Υπολογιστικό μέρος, στην 4<sup>η</sup> μελέτη, έχοντας σαν εργαλείο την παράμετρο  $P_{cic}$ , μελετήσαμε τον εντοπισμό της επιδιόρθωσης των ΔΚΘ DNA σε σχέση με την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. **Εικόνα Θ5-8.** Στις περιοχές όπου το  $P_{cic}$  είναι μικρότερο της μονάδας ενδέχεται οι ΔΚΘ να εντοπίζονται στην ευχρωματίνη, ενώ στις περιοχές όπου το  $P_{cic}$  είναι μεγαλύτερο της μονάδας ενδέχεται οι ΔΚΘ να εντοπίζονται στην ετεροχρωματίνη.



Εικόνα 05-8: Μία εφαρμογή της παραμέτρου  $Pclc$  για τον εντοπισμό ΔΚΘ σε ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές. Το  $Pclc$ , έχοντας ως κανάλι ανίχνευσης το μπλε, ορίζεται ως ο λόγος του μέσου όρου της έντασης του μπλε καναλιού στην περιοχή  $a$ , προς το μέσο όρο της έντασης του ίδιου καναλιού στην περιοχή  $b$ . Στις περιοχές όπου το  $Pclc$  είναι μικρότερο της μονάδας ενδέχεται οι ΔΚΘ να εντοπίζονται στην ευχρωματίνη, ενώ στις περιοχές όπου το  $Pclc$  είναι μεγαλύτερο της μονάδας ενδέχεται οι ΔΚΘ να εντοπίζονται στην ετεροχρωματίνη. Πηγή: *Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis*

## Βιβλιογραφία

1. Gamma H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. Cowell IG<sup>1</sup>, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ.2007
2. Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 2001;276:47759–47762.
3. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, et al. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA-double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem.* 2003;278:20303–20312.
4. Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM. Differential Subnuclear Localization and Replication Timing of Histone H3 Lysine 9 Methylation States. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2872–2881
5. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*273: 5858–5868.
6. H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene diol epoxides. Mattsson A<sup>1</sup>, Jernström B, Cotgreave IA, Bajak E.2009
7. HP1-β mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response Nabieh Ayoub, Anand D. Jeyasekharan, Juan A. Bernal & Ashok R. Venkitaraman *Nature* volume 453, pages 682–686 (29 May 2008)
8. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. Kuo LJ<sup>1</sup>, Yang LX.,2008
9. Paull, T. T., E. P. Rogakou, et al. (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Curr Biol* 10(15): 886-95.
10. Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, et al. (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." *Radiat Res* 158(4): 486-92.
11. Douglas, P., J. Zhong, et al. "Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX." *Mol Cell Biol* 30(6): 1368-81
12. Banath, J. P. and P. L. Olive (2003). "Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks." *Cancer Res* 63(15): 4347-50
13. γH2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin Andrea Kinner, Wenqi Wu, Christian Staudt, and George Iliakis\*2008
14. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421:499–506.
15. Biomarkers Definitions Working Group (March 2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework". *Clin. Pharmacol. Ther.* (Review). 69 (3): 89–95. doi:10.1067/mcp.2001.113989. PMID 11240971. as cited in Siderowf A, Aarsland D, Mollenhauer B, Goldman JG, Ravina B (April 2018).

- "Biomarkers for cognitive impairment in Lewy body disorders: Status and relevance for clinical trials". *Mov. Disord.* (Review). 33 (4): 528–36
16. «Ανάλυση Βιοδεικτών-Βιοαισθητήρες. Κλινική σημασία», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, καθ. Τσελέπης Α. (συντονιστής)
  17. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. Ji J<sup>1</sup>, Zhang Y<sup>1</sup>, Redon CE<sup>2</sup>, Reinhold WC<sup>2</sup>, Chen AP<sup>3</sup>, Fogli LK<sup>4</sup>, Holbeck SL<sup>4</sup>, Parchment RE<sup>1</sup>, Hollingshead M<sup>4</sup>, Tomaszewski JE<sup>4</sup>, Dudon Q<sup>2</sup>, Pommier Y<sup>2</sup>, Doroshow JH<sup>2,4</sup>, Bonner WM<sup>2</sup>, 2017
  18. Bourton EC, Plowman PN, Zahir SA, Senguloglu GU, Serrai H, Bottley G, et al. Multispectral imaging flow cytometry reveals distinct frequencies of gamma-H2AX foci induction in DNA double strand break repair defective human cell lines. *Cytometry A*. 2012;81: 130–7. doi: 10.1002/cyto.a.21171
  19. Cytometric Assessment of Histone H2AX Phosphorylation, A Reporter of DNA Damage Xuan Huang and Zbigniew Darzynkiewicz, 2006
  20. Tumor Suppressor P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is Involved in DNA Damage–Signaling Pathways, Irene Rappold,<sup>a</sup> Kuniyoshi Iwabuchi,<sup>a</sup> Takayasu Date,<sup>b</sup> and Junjie Chen<sup>a</sup> 2001
  21. Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET) Zacharenia Nikitaki, Vladimir Nikolov, Ifigeneia V. Mavragani, Emil Mladenov, Anastasios Mangelis, Danae A. Laskaratou, Georgios I. Fragkoulis, Christine E. Hellweg, Olga A. Martin, Dimitris Emfietzoglou, Vasiliki I. Hatz, Georgia I. Terzoudi, George Iliakis & Alexandros G. Georgakilas show less
  22. Non-DSB clustered DNA lesions. Does theory colocalize with the experiment? *Radiat Phys Chem* 2016;128:26–35. Nikitaki Z, Nikolov V, Mavragani IV, Plante I, Emfietzoglou D, Iliakis G, Georgakilas AG
  23. Sino Biological Inc./Biological Solution Specialist: ELISA encyclopedia.
  24. Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis. Ifigeneia V. Mavragani, Zacharenia Nikitaki, Maria P. Souli, Asef Aziz, Somaira Nowsheen, Khaled Aziz, Emmy Rogakou and Alexandros G. Georgakilas

## *Β' ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*

## Κεφάλαιο 6

### 1<sup>η</sup> μελέτη: Μέτρηση των εστιών των πρωτεϊνών

#### γH2AX και 53BP1

Όλες οι αναλύσεις που θα ακολουθήσουν αναφέρονται ένα πείραμα με ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνωμα του πνεύμονα τύπου A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες -X, παρουσία ή μη του αναστολέα της DNA-PK, NU7441.

#### 1.1 Σκοπός

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εξετασθεί πώς συμπεριφέρονται οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των Δίκλωνων Θραύσεων (ΔΚΘ), γH2AX και 53BP1, στα καρκινικά κύτταρα A549. Αρχικά, μελετάται και μετρώνται για διάφορες δόσεις των 0 Gy, 1 Gy, 2Gy, 4Gy και για διαφορετικές χρονικές στιγμές 15 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, η δημιουργία εστιών φθορισμού με αναστολέα της DNA-PK, NU7441, αλλά και χωρίς αναστολέα. Η DNA- εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK) διαδραματίζει βασικό ρόλο στην επιδιόρθωση των ΔΚΘ του DNA που είναι πιθανόν η πιο επιβλαβής μορφή βλάβης του DNA, αφού η βασική οδός για την επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων είναι η Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων, η οποία απαιτεί τη δραστηριοποίηση της DNA-PK. Ο αναστολέας NU7441, είναι ένας ισχυρός και ειδικός αναστολέας της DNA-PK και έχει προβλεφθεί ότι ενισχύει το θεραπευτικό αποτέλεσμα της επαγωγής των ΔΚΘ του DNA και επιπλέον έχει τη δυνατότητα αύξησης της ακτινοευαισθησίας σε διάφορους όγκους, συμπεριλαμβανομένου και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, κύτταρα του οποίου αποτελούν τη σειρά A549. [1]

#### 1.2 Μεθοδολογία

Οι εικόνες που αναλύθηκαν προέρχονται από συνεστιακό μικροσκόπιο και η ανάλυση έγινε με το λογισμικό *IMARIS* της Bitplane. Οι εικόνες που αναλύθηκαν μέσω αυτού του λογισμικού ήταν τρισδιάστατες, 3D τύπου .lif, και η ανάλυση τους έγινε με κατάλληλο αλγόριθμο και παραμέτρους, προκειμένου να καταμετρηθούν οι εστίες φθορισμού και



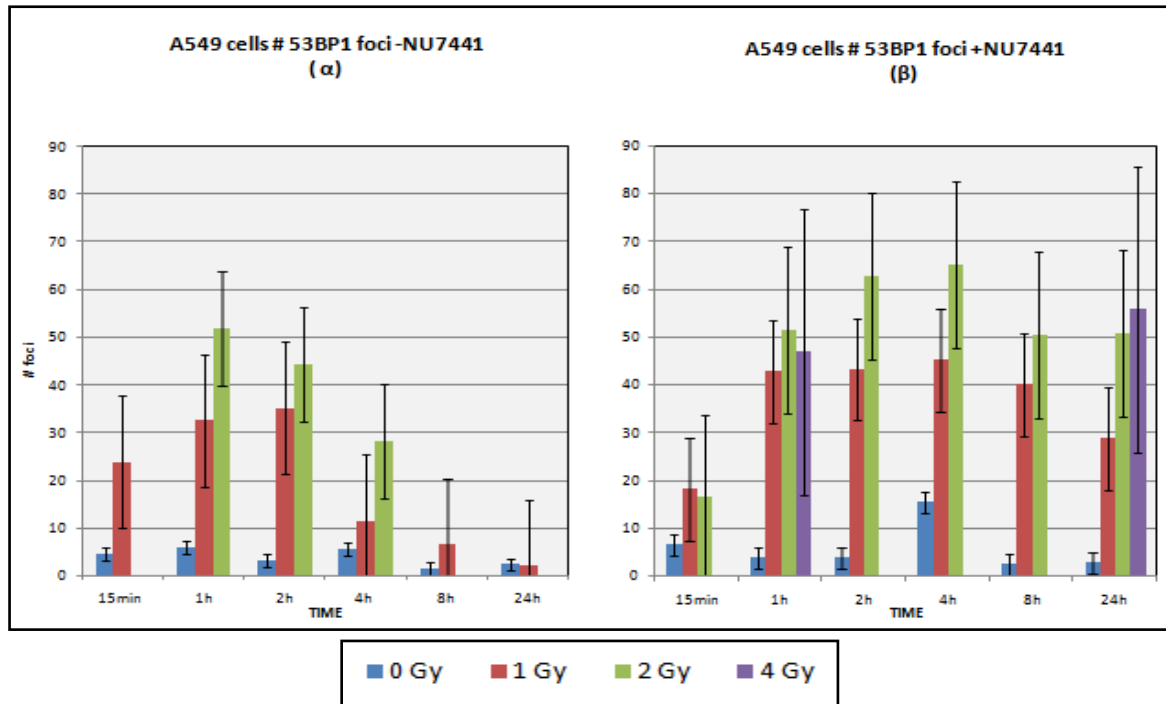
τα γεγονότα συνεντοπισμού. Στη συνέχεια, για τις επόμενες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά επεξεργασίας εικόνων, JCountPro και JQuantPlus, τα οποία αναπτύχθηκαν από τον δρ. Pavel Lobachevsky (Peter McCallum Institute, Melbourne, Australia). Για να γίνει δυνατή η ανάλυση των εικόνων με αυτά τα λογισμικά, χρησιμοποιήθηκε το ImageJ για την μετατροπή των εικόνων τύπου .lif που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο, σε τύπου .tif, δηλαδή οι εικόνες έγιναν 2D. Η διαδικασία μετατροπής έγινε ως εξής:

Επιλέγεται ένα ενδιάμεσο επίπεδο εστίασης από τα αρχεία .lif και εξάγεται ως .tif

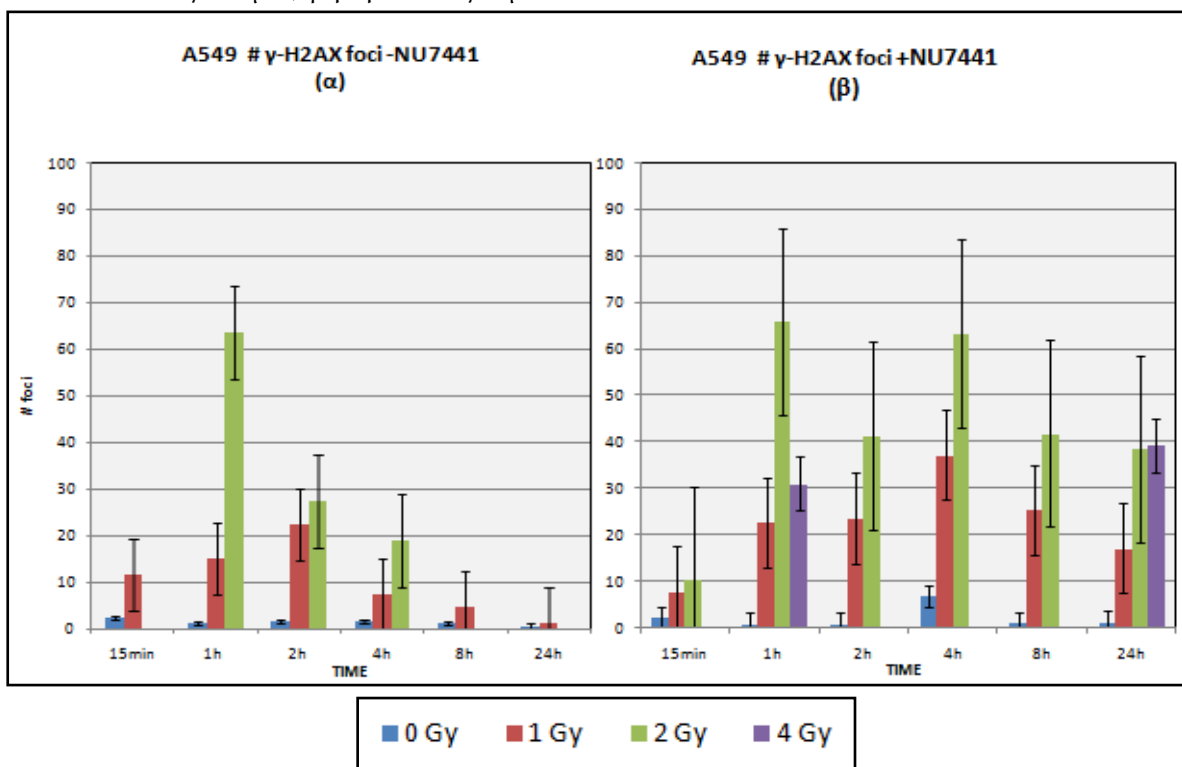
1. Κατεβάζουμε το Locitools για το ImageJ, ώστε να μπορούν να διαβαστούν οι εικόνες .lif (<http://downloads.openmicroscopy.org/bio-formats/4.4.12/> ) και το αποθηκεύουμε στον φάκελο *plugins* του *ImageJ*.
2. Ανοίγουμε το *ImageJ*. Από τη γραμμή εργαλείων *Plugins-> LOCI -> BIO-formats Importer*, επιλέγουμε *LOCI plugins Shortcut Window* για να έχουμε το plugin σε παράθυρο. Σε αυτό το σημείο επιλέγουμε την εικόνα που θέλουμε να φτιάξουμε. Επιλέγουμε *Hyperstack* στο πρώτο κουτί και *Split Channels*.
3. Μέσω της *Image-> Colors-> Merge* αντιστοιχίζουμε τα κανάλια με τα χρώματα, όπου *Ch1= κόκκινο*, *Ch2= πράσινο* και *Ch3= μπλε*. Για το συγκεκριμένο πείραμα βάζουμε *Ch1* το *C2* της εικόνας, *Ch2* το *C1* της εικόνας και *Ch3* το *C0* της εικόνας.
4. Από το μενού *Image-> Duplicate*. Σε αυτό το παράθυρο επιλέγουμε τη «φέτα» που θέλουμε στο πλαίσιο και απεπιλέγουμε το *Duplicate Stack*.
5. Για την αποθήκευση επιλέγουμε το *Saveas.tif* όπου θέλουμε να μαζέψουμε τη συλλογή που θα αναλύσουμε.

### 1.3 Υπολογιστικά Αποτελέσματα

Ακολουθεί η ανάλυση μέσω του *IMARIS* και παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα. Οι πίνακες των αριθμητικών δεδομένων δίνονται στο παράρτημα, στο τέλος της 1<sup>ης</sup> μελέτης.



Γράφημα 1-1: Επαγόμενες εστίες φθορισμού ανά κύτταρο στην πορεία του χρόνου συναρτήσει της δόσης ακτινοβολίας για κύτταρα A549 (α) χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441 και (β) με αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441 για την πρωτεΐνη 53BP1. Η ανάλυση των εικόνων έγινε με χρήση του λογισμικού IMARIS.



Γράφημα 1-2: Επαγόμενες εστίες φθορισμού ανά κύτταρο στην πορεία του χρόνου συναρτήσει της δόσης ακτινοβολίας για κύτταρα A549 (α) χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441 και (β) με αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441 για την πρωτεΐνη γH2AX. Η ανάλυση των εικόνων έγινε με χρήση του λογισμικού IMARIS.

## 1.4 Παρατηρήσεις- Συμπεράσματα

Για 0 Gy και για τις δύο πρωτεΐνες, παρατηρούμε ότι οι διακυμάνσεις είναι πολύ μικρές και μη αξιολογήσιμες σε βιολογικό επίπεδο, καθώς οι αρχικές και οι τελικές τιμές με την πάροδο του χρόνου μένουν σχεδόν ίδιες. Υπό όλες τις συνθήκες, το πλήθος κυμαίνεται μεταξύ 1-7 εστίες.

Σχετικά με τον αριθμό των επαγόμενων εστιών 53BP1:

α) Χωρίς αναστολέα: Για 1 Gy παρατηρείται αύξηση των εστιών 53BP1 από 15min έως και τις 2h όπου και έχουμε το μέγιστο της καμπύλης. Στις 4h ξεκινάει η μείωσή τους και στις 24h έχουν μειωθεί σημαντικά. Για 2 Gy παρατηρείται το μέγιστο στη 1h, ενώ σημαντική μείωση παρατηρείται από τις 4h και μετά. **Γράφημα 1-1 (α)**

β) Με αναστολέα: Για 1 Gy παρατηρείται ανοδική τάση από 15min έως και τις 4h όπου έχουμε και το μέγιστο στις 4h. Στις 8h ξεκινάει η μείωσή τους. Για τα 2 Gy παρατηρείται ότι από τα 15min μέχρι τη 1h έχουμε σημαντική αύξηση των εστιών και συνεχίζει η ανοδική τάση μέχρι και τις 4h όπου έχουμε και το μέγιστο. Στη συνέχεια ξεκινάει και η μείωσή τους. Στις 8h και 24h η διαφορά είναι σχεδόν αμελητέα. **Γράφημα 1-1 (β)**

Σχετικά με τον αριθμό των επαγόμενων εστιών  $\gamma$ H2AX:

α) Χωρίς αναστολέα: Για 1 Gy παρατηρείται το μέγιστο στις 2h, όπως συμβαίνει και στις εστίες της 53BP1 και στη συνέχεια ξεκινάει η μείωσή τους. Οι εστίες αυτές είναι σε πληθυσμό λιγότερες από τις αντίστοιχες της 53BP1. Για 2 Gy παρατηρείται το μέγιστο στη 1h με μετέπειτα μείωση. **Γράφημα 1-2 (α)**

β) Με αναστολέα: Για 1 Gy παρατηρείται σημαντική αύξηση από 15min μέχρι τη 1h όπου συνεχίζει η ανοδική τάση και έχουμε το μέγιστο στις 4h. Στη συνέχεια ξεκινάει η μείωση των εστιών. Για 2 Gy έχουμε μόνο δύο πειραματικά σημεία της 1h και των 24h. Το μέγιστο αναμένεται περίπου στις 4h, στις 24h τα επίπεδα των παραμενουσών βλαβών είναι υψηλότερα από τα επίπεδα των εστιών που είχαν σχηματιστεί στη μία ώρα. **Γράφημα 1-2 (β)**

Στην περίπτωση απουσίας αναστολέα, παρατηρούμε ότι ο αριθμός των επαγόμενων εστιών και των δύο πρωτεϊνών, 53BP1 και  $\gamma$ H2AX, περιγράφεται από την εξής σχέση: Παρουσιάζουν μέγιστο στη 1h και στη συνέχεια μειώνονται **Γράφημα 1-1 (α), 1-2 (α)**. Κατά την παρουσία αναστολέα, παρατηρούμε ότι ο αριθμός των εστιών, τόσο της  $\gamma$ H2AX όσο και της 53BP1, μέχρι και τις 24h παραμένουν σε υψηλά επίπεδα συγκριτικά με την περίπτωση που δεν υπάρχει αναστολέας, **Γράφημα 1-1 (β), 1-2 (β)**. Αυτό δείχνει, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι ο αναστολέας δυσχεραίνει την επιδιόρθωση των βλαβών.

Σε αυτό το σημείο παρατίθεται η ποσοστιαία επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων, **Πίνακας Υ1-1**, των επιδιορθωμένων βλαβών ως προς τις αρχικές τιμές αυτών. Σαν αρχική λαμβάνεται η τιμή που έχουν 15min από την ακτινοβολήση και τελική η τιμή στις 24h.

Εξεταζόμενο δείγμα	Δόση	Δόση	Δόση
	1Gy	2 Gy	4 Gy
53BP1 -NU 7441	92%		
53BP1 +NU 7441	-61%	-211%	-19 % *
γH2AX -NU 7441	91%		
γH2AX +NU 7441	-118%	-277%	-27%*

*Πίνακας Υ1-1: Ποσοστιαία επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων, των επιδιορθωμένων βλαβών ως προς τις αρχικές τιμές αυτών.*

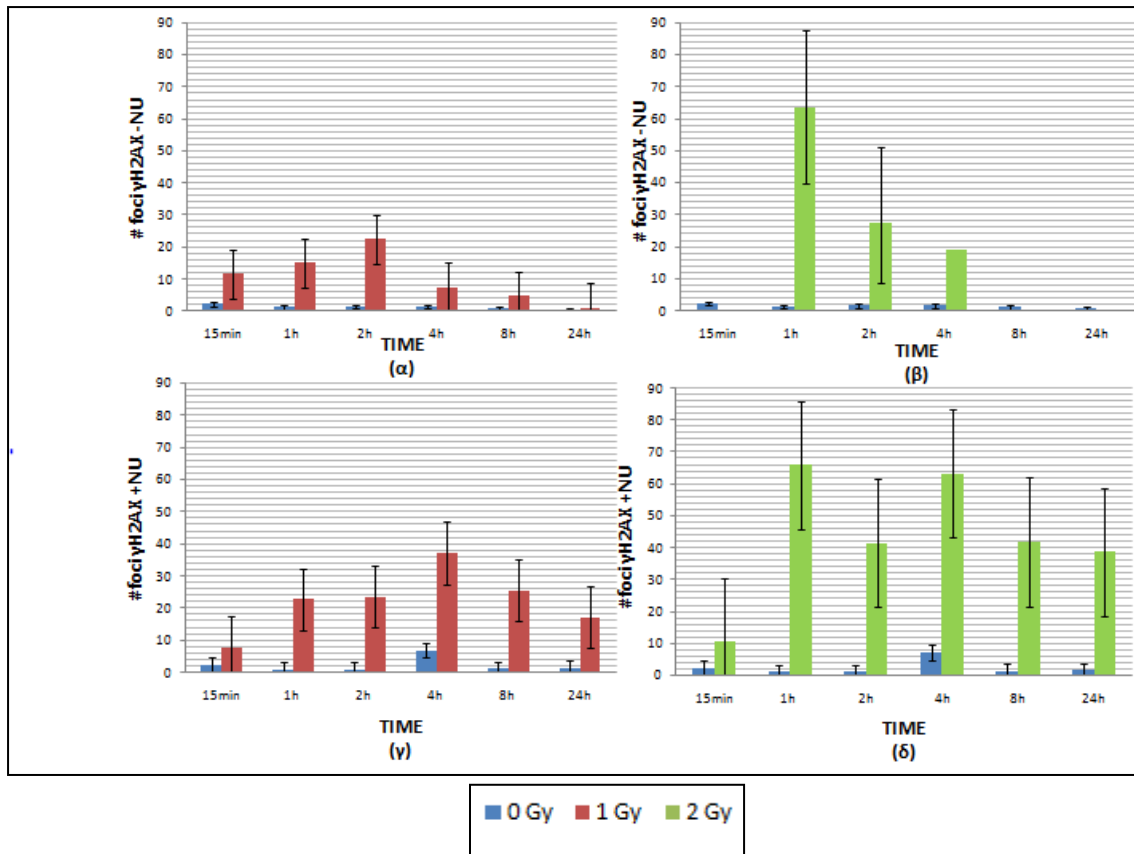
\*εξαίρεση αποτελούν τα σημεία αυτά, στα οποία έχει ληφθεί ως αρχική τιμή η τιμή της 1 h. Η φυσική σημασία του μείον είναι, ότι η αρχική τιμή είναι μικρότερη από την τελική, και επομένως έχουμε αύξηση των εστιών. Το ποσοστό έχει υπολογισθεί ως

$$\frac{\text{αρχικήτιμή} - \text{τελικήτιμή}}{\text{αρχικήτιμή}} * 100.$$

Ακόμα, το μέγιστο των κορυφών και στις δύο πρωτεΐνες επίσης, κατά την παρουσία του αναστολέα κυμαίνεται περίπου στις 4h σε αντίθεση με την περίπτωση που δεν υπάρχει αναστολέας και το μέγιστο των κορυφών βρίσκεται στη 1 h περίπου, **Γράφημα 1-1,1-2**

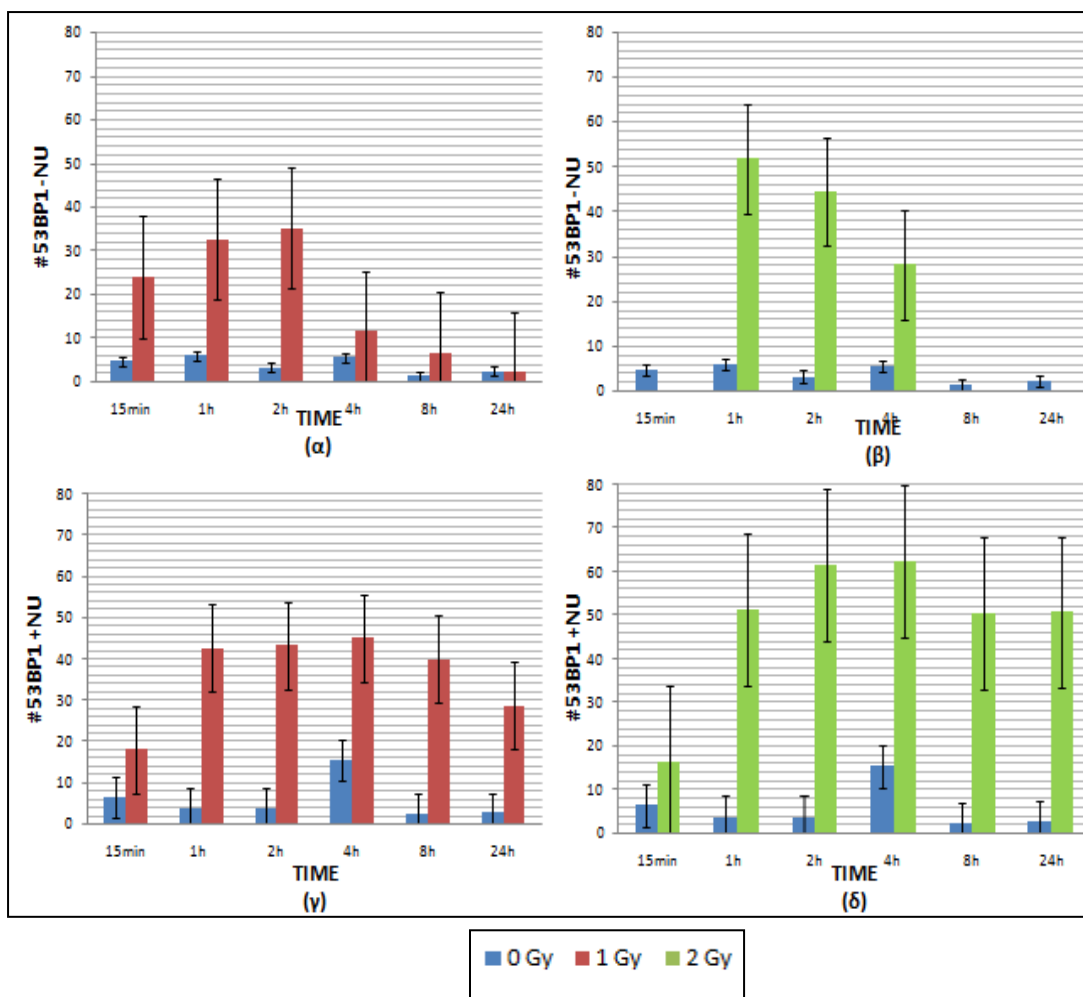
Οι παρατηρήσεις αυτές απεικονίζονται συνοπτικά και στα παρακάτω διαγράμματα, για τις τρεις διαφορετικές δόσεις και τις 2 διαφορετικές πρωτεΐνες, τα οποία δείχνουν τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών με την παρουσία και μη αναστολέα. ( $\pm$  NU 7441). Γίνεται φανερό και οπτικά, ότι υπάρχουν πολύ σημαντικές αυξήσεις στον αριθμό των εστιών, τόσο των γH2AX όσο και των 53BP1, **Γράφημα 1-3** και **Γράφημα1-4**, στα ακτινοβολημένα και μη ακτινοβολημένα κύτταρα.

Αρχικά, παρατίθενται τα διαγράμματα για τον αριθμό των επαγόμενων εστιών γH2AX, συγκριτικά για τα μη ακτινοβολημένα (0 Gy) και τα ακτινοβολημένα κύτταρα.



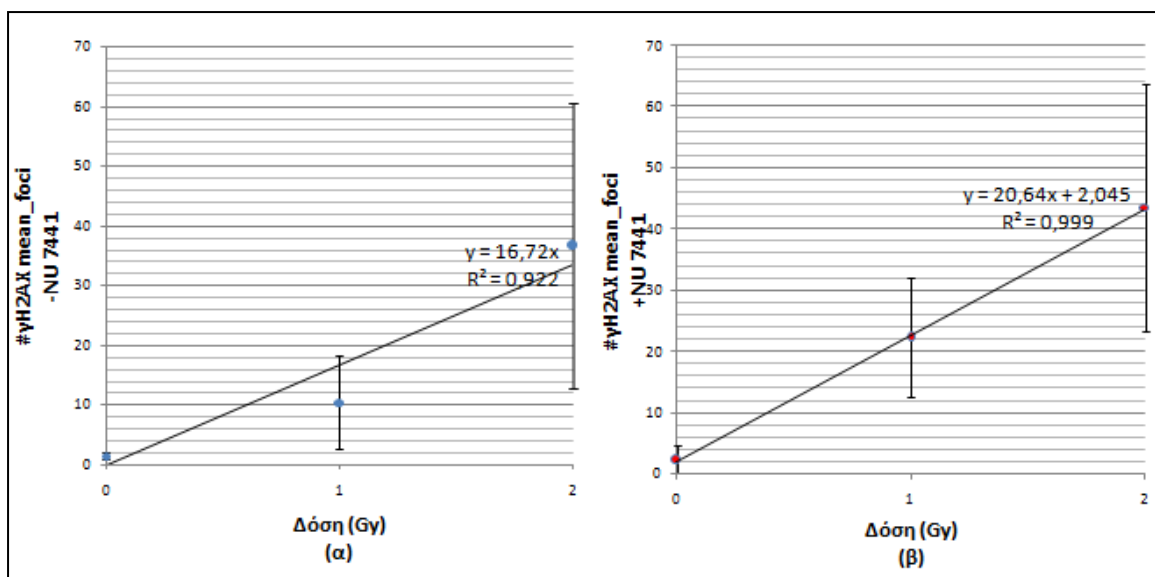
Γράφημα 1-3: Σύγκριση των επαγόμενων εστιών φθορισμού ανά κύτταρο για την πρωτεΐνη  $\gamma$ H2AX, για μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα κύτταρα στην πορεία του χρόνου, για κύτταρα A549. (α) αριθμός εστιών  $\gamma$ H2AX στα κύτταρα για 0 Gy και 1 Gy χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441, (β) αριθμός εστιών  $\gamma$ H2AX στα κύτταρα για 0 Gy και 2 Gy χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441, (γ) αριθμός εστιών  $\gamma$ H2AX στα κύτταρα για 0 Gy και 1 Gy με αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441, (δ) αριθμός εστιών  $\gamma$ H2AX στα κύτταρα για 0 Gy και 2 Gy με αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441. Η ανάλυση των εικόνων έγινε με χρήση του λογισμικού IMARIS.

Στη συνέχεια, παρατίθενται **το Γράφημα 1-4**, για τον αριθμό των επαγόμενων εστιών 53BP1, συγκριτικά για τα μη ακτινοβολημένα (0 Gy) και τα ακτινοβολημένα κύτταρα.

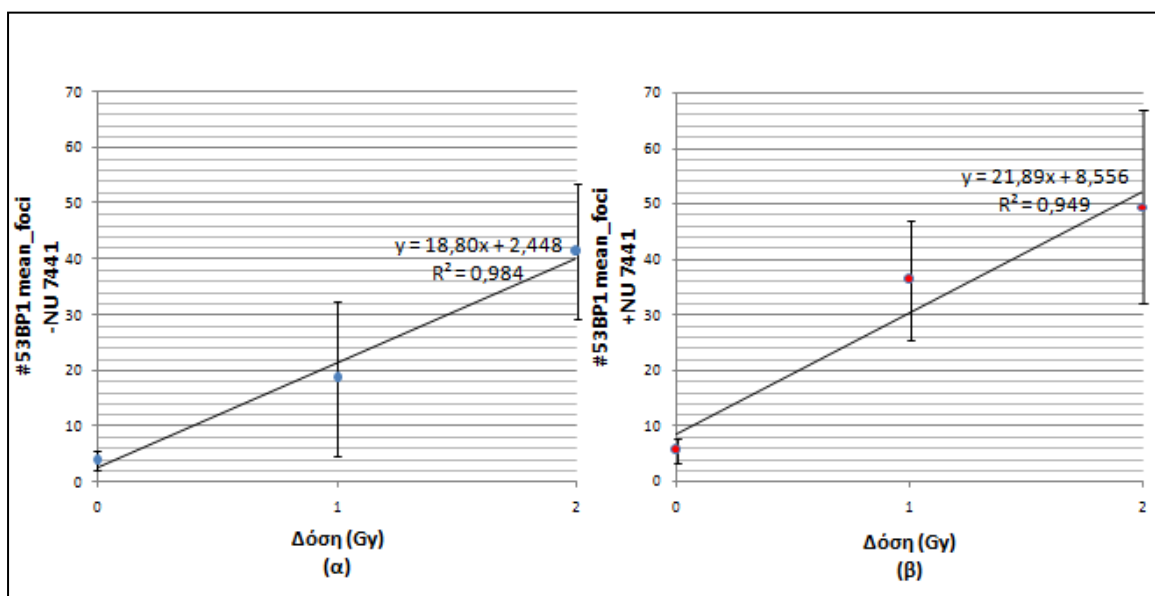


Γράφημα 1-4: Σύγκριση των επαγόμενων εστιών φθορισμού ανά κύτταρο για την πρωτεΐνη 53BP1, για μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα κύτταρα στην πορεία του χρόνου, για κύτταρα A549. (α) αριθμός εστιών 53BP1 στα κύτταρα για 0 Gy και 1 Gy χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441, (β) αριθμός εστιών 53BP1 στα κύτταρα για 0 Gy και 2 Gy χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441, (γ) αριθμός εστιών 53BP1 στα κύτταρα για 0 Gy και 1 Gy με αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441, (δ) αριθμός εστιών 53BP1 στα κύτταρα για 0 Gy και 2 Gy με αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441. Η ανάλυση των εικόνων έγινε με χρήση του λογισμικού IMARIS.

Τέλος, για κάθε δόση επιλέχθηκε ο μέσος αριθμός εστιών (foci) γH2AX και 53BP1 με αναστολέα και χωρίς αναστολέα. Γράφημα 1-5 και Γράφημα 1-6 Τα διαγράμματα δίνονται παρακάτω.



Γράφημα 1-5: Γραμμική συσχέτιση του μέσου όρου των επαγόμενων εστιών  $\gamma$ H2AX συναρτήσει της δόσης για (α) κύτταρα χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης και (β) κύτταρα με παρουσία αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441.



Γράφημα 1-6: Γραμμική συσχέτιση του μέσου όρου των επαγόμενων εστιών 53BP1 συναρτήσει της δόσης για (α) κύτταρα χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης με και (β) κύτταρα με παρουσία αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441.

Το συμπέρασμα που βγάζουμε από το διάγραμμα απόκρισης της δόσης με τις επαγόμενες φθορίζουσες εστίες είναι το εξής: Παρατηρούμε σημαντικές αυξήσεις στον αριθμό των εστιών γΗ2ΑΧ και 53BP1 σε σύγκριση με το μη ακτινοβολημένο κύτταρο. Μέχρι τα 2 Gy που έχουν εφαρμοστεί, η μέγιστη ποσότητα αυξάνεται γραμμικά.

Συγκεκριμένα, η σχέση δόσης-απόκρισης για την γΗ2ΑΧ προσαρμόζεται στη συνάρτηση  $y = 17,72x$  απουσία αναστολέα, **Γράφημα 1-6(α)** με γραμμική συσχέτιση  $R^2=0,922$ , ενώ παρουσία αναστολέα προσαρμόζεται στη συνάρτηση  $y=20,64x+2,045$  με γραμμική συσχέτιση  $R^2=0,999$ , **Γράφημα 1-6(β)**. Αντίστοιχα, η σχέση δόσης-απόκρισης για την 53BP1 προσαρμόζεται στη συνάρτηση  $y = 18,80x + 2,448$  απουσία αναστολέα, **Γράφημα 1-7(α)** με γραμμική συσχέτιση  $R^2=0,984$ , ενώ παρουσία αναστολέα προσαρμόζεται στη συνάρτηση  $y=21,89x+8,556$  με γραμμική συσχέτιση  $R^2=0,949$ , **Γράφημα 1-7(β)**. Αυτή η σχέση δόσης-απόκρισης είναι προσαρμοσμένη επομένως με μία γραμμική παλινδρόμηση:  $y=Ax + B$ , όπου  $y=$  ο αριθμός των εστιών γΗ2ΑΧ και 53BP1 αντίστοιχα, και  $x$  είναι η δόση της ακτινοβολίας σε Gy. **Γράφημα 1-6,1-7**

Και στις δύο περιπτώσεις ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είναι πολύ κοντά στο +1, οπότε υπάρχει πολύ καλή θετική γραμμική συσχέτιση στο δείγμα για αυτές τις δόσεις. Τα σφάλματα των διαγραμμάτων είναι υπολογισμένα με την χρήση της συνάρτησης  $stdev$ , δηλαδή είναι η τυπική απόκλιση η οποία αποτελεί ένα μέτρο της διασποράς των τιμών του δείγματος των εστιών των κυττάρων σε σχέση με την τιμή του μέσου όρου.

Επομένως, ο αριθμός, καθώς και η εμφάνιση και εξαφάνιση των εστιών 53BP1, ταιριάζει με εκείνη του γΗ2ΑΧ (είναι της ίδιας τάξης).

Τέλος, παρατηρείται ότι σε αυτές τις δόσεις ο αριθμός των εστιών της γΗ2ΑΧ είναι μικρότερος από της 53BP1, με εξαίρεση στη 1h και για 2 Gy. Αυτό που προβλέπεται, είναι ότι σε μεγαλύτερες δόσεις, ο αριθμός των εστιών 53BP1 θα είναι μικρότερος των εστιών γΗ2ΑΧ επαληθεύοντας ότι η 53BP1 υπάρχει ενδογενώς σε αντίθεση με τη γΗ2ΑΧ που δεν έχει ενδογενή συγκέντρωση και έτσι τα μόρια της 53BP1 δεν επαρκούν να σχηματίσουν εστίες γύρω από κάθε ΔΚΘ. Επιπλέον, για μεγαλύτερες δόσεις η γραμμικότητα και των δύο πρωτεϊνών χάνεται, όπως έχει αποδειχθεί πειραματικά. Οι εστίες -foci- που παρατηρούνται στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα, δείχνει ότι τα κύτταρα έχουν υποστεί άλλου είδους στρες εκτός από την ακτινοβολία.

Έχοντας ως γνώμονα την παραπάνω ανάλυση συνεχίζουμε με την επόμενη μελέτη.



## Παράρτημα 1<sup>ης</sup> μελέτης

### A549 cells # 53BP1 foci -NU7441

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0 Gy	4,577	5,95	3,18	5,43	1,31	2,3
1 Gy	23,82	32,6	35,13	11,43	6,39	2,04
2 Gy		51,7	44,42	28,09		

### A549 cells # 53BP1 foci +NU7441

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0 Gy	6,37	3,64	3,67	15,33	2,24	2,64
1 Gy	17,98	42,64	43,26	45,01	39,94	28,75
2 Gy	16,31	51,45	62,68	65,13	50,31	50,71
4 Gy		46,94				55,66

### A549 # $\gamma$ H2AX foci -NU7441

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0 Gy	2,22	1,21	1,56	1,55	1,06	0,58
1 Gy	11,63	15,12	22,47	7,31	4,79	1,01
2 Gy		63,62	27,43	18,81		

### A549 # $\gamma$ H2AX foci +NU7441

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0 Gy	2,24	0,93	0,88	6,93	1,13	1,35
1 Gy	7,84	22,69	23,57	37,13	25,45	17,09
2 Gy	10,26	65,95	41,38	63,29	41,79	38,54
4 Gy		31,07				39,32

## 2<sup>η</sup> μελέτη: Σύγκριση των λογισμικών IMARIS και JQuantPlus, για τη μέτρηση των εστιών γH2AX και 53BP1

### 2.1 Σκοπός

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η διερεύνηση της δυνατότητας καταμέτρησης των εστιών φθορισμού από εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (3D) με το λογισμικό JQuantPlus, το οποίο αναλύει εικόνες 2D. Για να επιτευχθεί ο στόχος αυτός γίνεται μετατροπή των τρισδιάστατων εικόνων σε δισδιάστατες μέσω του λογισμικού ImageJ και του μετασχηματισμού *Z-Projection ->MaxIntensity*. Ως αναφορά των ορθών αποτελεσμάτων δεχόμαστε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση με το IMARIS το οποίο αναλύει τις εικόνες 3D. Από τη φύση της προσέγγισης αναμένουμε σημαντικές αποκλίσεις για εικόνες με πολλές εστίες φθορισμού, λόγω της αλληλεπικάλυψης εστιών που βρίσκονται σε κοντινές συντεταγμένες x και y αλλά με διαφορετικό z. Επομένως με την ακόλουθη ανάλυση αναζητούμε το όριο είτε με όρους δόσης είτε με όρους αριθμού εστιών, για το οποίο η ανάλυση εικόνων 2D μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής.

### 2.2 Μεθοδολογία της Ανάλυσης

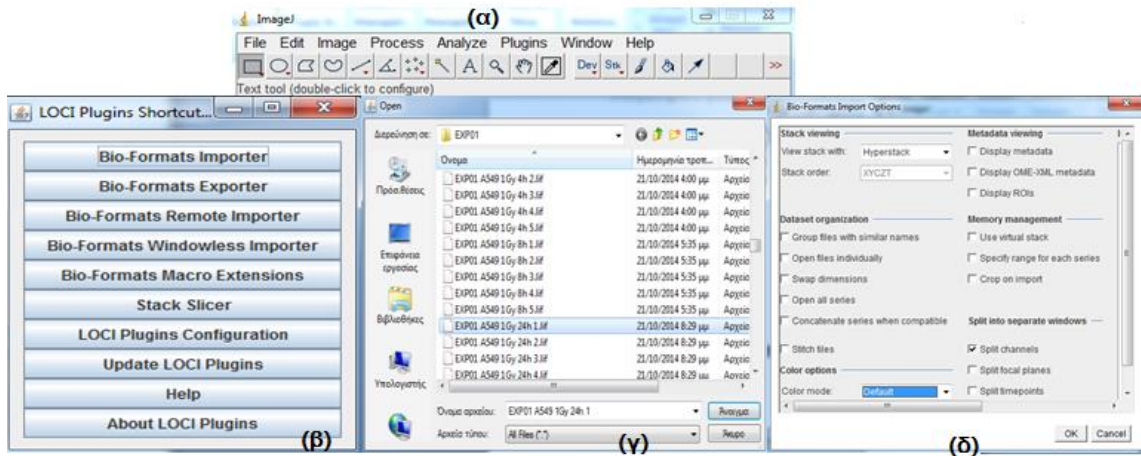
Επαναλαμβάνεται ο υπολογισμός των foci των πρωτεϊνών με χρήση τριών λογισμικών, ImageJ, JCountPro και JQuantPlus.

#### 2.2.1 Η χρήση του λογισμικού ImageJ

Προκειμένου να γίνει δυνατή η ανάλυση των εικόνων με αυτά τα λογισμικά JCountPro και JQuantPlus, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ για την μετατροπή των 3-D εικόνων τύπου .lif που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο, σε τύπου .tif, δηλαδή οι εικόνες έγιναν 2-D. Η διαδικασία μετατροπής έγινε ως εξής:

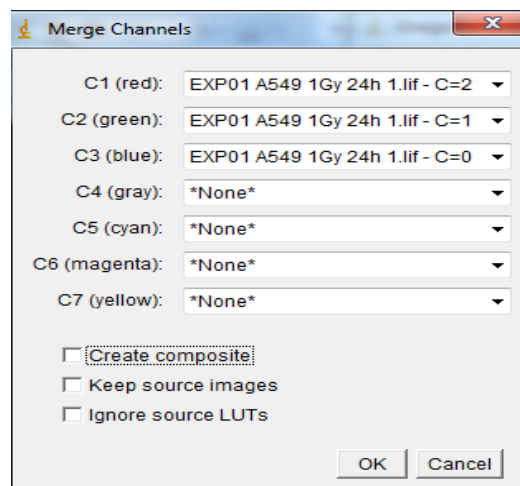
1. Κατεβάζουμε το Loci tools για το ImageJ, ώστε να μπορούν να διαβαστούν οι εικόνες .lif (<http://downloads.openmicroscopy.org/bio-formats/4.4.12/>) και το αποθηκεύουμε στον φάκελο plugins του ImageJ.
2. Ανοίγουμε το ImageJ και εμφανίζεται η καρτέλα της **Εικόνας Υ2-1α**. Από τη γραμμή εργαλείων Plugins-> LOCI ->BIO-formats Importer, επιλέγουμε LOCI

plugins Shortcut Window για να έχουμε το plugin σε παράθυρο, **Εικόνα Υ2-1β**. Σε αυτό το σημείο επιλέγουμε την εικόνα που θέλουμε να φτιάξουμε, **Εικόνα Υ2-1γ**. Στη συνέχεια, επιλέγουμε Hyperstack στο πρώτο κουτί και Split Channels, **Εικόνα Υ2-1δ**.



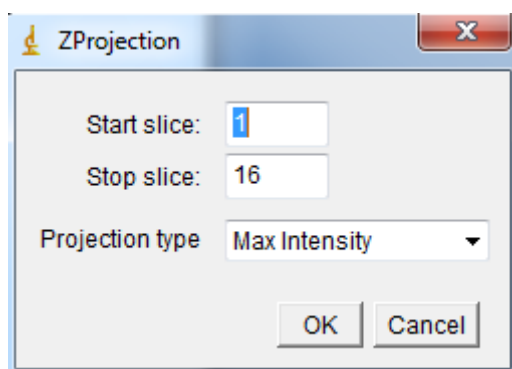
Εικόνα Υ2-1: Στιγμιότυπο επεξήγησης του βήματος 2.

- Μέσω της Image-> Colors-> Merge αντιστοιχίζουμε τα κανάλια με τα χρώματα για το τρέχον πείραμα, όπου Ch1= κόκκινο, Ch2= πράσινο και Ch3= μπλε. Για το συγκεκριμένο πείραμα βάζουμε Ch1 το C2 της εικόνας, Ch2 το C1 της εικόνας και Ch3 το C0 της εικόνας. **Εικόνα Υ2-2**.



Εικόνα Υ2-2: Στιγμιότυπο επεξήγησης του βήματος 3.

- Στη συνέχεια, μέσω της Image-> Stacks-> ZProjection επιλέγουμε τον τύπο της προβολής (Projection type), τη Max Intensity (Μέγιστη Ένταση). **Εικόνα Υ2-3**.



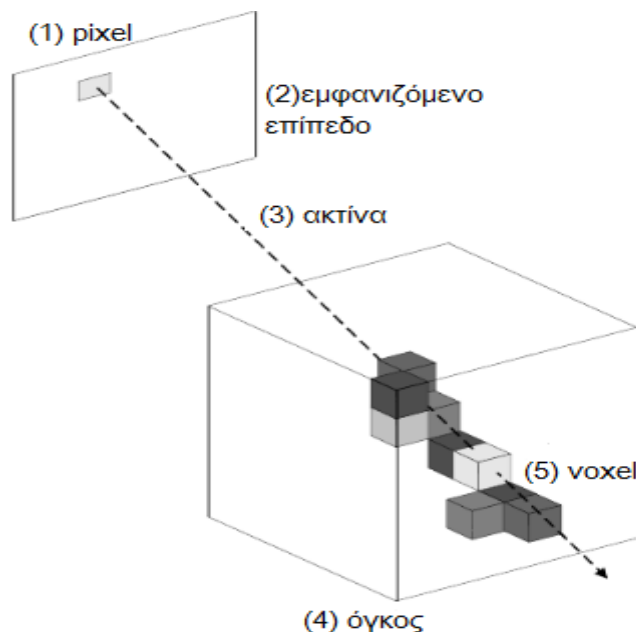
Εικόνα Υ2-3: Στιγμιότυπο επεξήγησης του βήματος 4.

5. Για την αποθήκευση επλέγουμε το Save as > .tiff όπου θέλουμε να μαζέψουμε τη συλλογή που θα αναλύσουμε.

Ακολουθούν κάποιες επεξηγήσεις σχετικά με την επιλογή της παραπάνω μεθοδολογίας για την μετατροπή των εικόνων σε εικόνες δύο διαστάσεων.

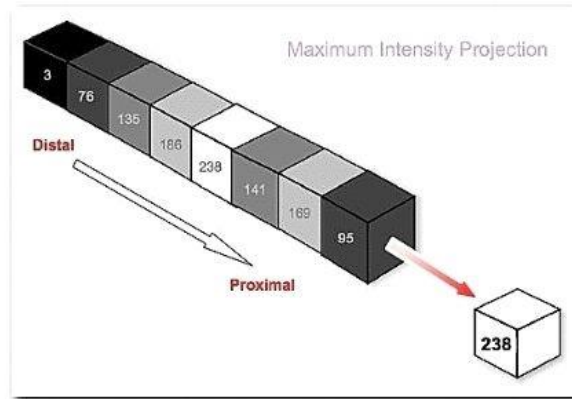
Η Z-Project είναι μία μέθοδος ανάλυσης μίας στοίβας εικόνων, η οποία επιτρέπει να εφαρμόσουμε διαφορετικές μεθόδους προβολής στα pixel της εκάστοτε στοίβας. Με την επιλογή της Z-Project, το παράθυρο που εμφανίζεται μας επιτρέπει να ορίσουμε το αρχικό και το τελικό επίπεδο της εικόνας που θα συμπεριληφθούν στη στοίβα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι για Z-Project ανάλογα με τα δεδομένα που θέλεις να παρουσιάσεις σε κάθε περίπτωση, αλλά ο προτιμώμενος για την επεξεργασία των εικόνων τέτοιας φύσης πειραμάτων είναι η Maximum Intensity Projection (MIP). Η MIP χρησιμοποιείται συχνά στην κλινική πρακτική για την απεικόνιση των αγγειακών δομών.

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται συνήθως για την MIP είναι η «προσπίπτουσα ακτίνα» (raycasting). Για κάθε pixel στην εικόνα εξόδου, μία ακτίνα προσπίπτει στον όγκο των δεδομένων. Η μέγιστη τιμή κατά μήκος της ακτίνας καθορίζεται και εμφανίζεται στην αντίστοιχη θέση των pixel. Επομένως, καθορίζεται το τελικό χρώμα του κάθε pixel με την μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της διαδρομής από κάθε αντίστοιχη ακτίνα. [1]



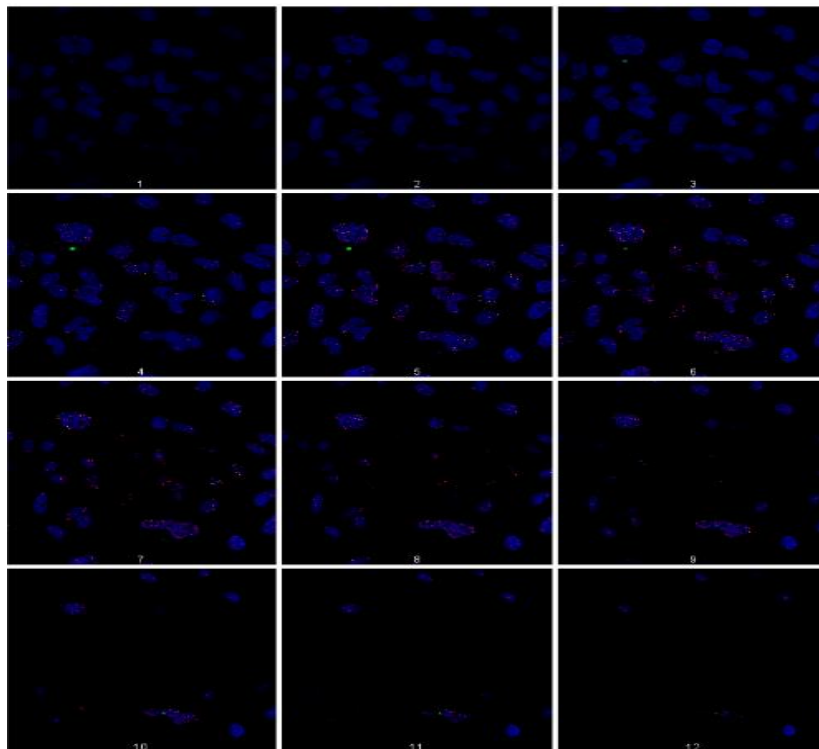
Εικόνα Υ2-4: Απεικόνιση βασικού αλγορίθμου της *MaximumIntensityProjection* (MIP). Για κάθε pixel (1) στο εμφανιζόμενο επίπεδο (2), μια ακτίνα (3) προσπίπτει στον όγκο (4). Αν και άλλα voxel διασταυρώνονται με την ακτίνα, μόνο το voxel με την υψηλότερη τιμή έντασης (5) προβάλλεται στο επίπεδο προβολής στη συγκεκριμένη θέση του αντίστοιχου pixel. (raycasting). Πηγή: «*Performing Maximum Intensity Projection with the Visualization Toolkit, Stefan Bruckner*»

Στη συγκεκριμένη εφαρμογή που παρουσιάζεται εδώ, καθώς πρόκειται για ZProjection-προβολή στον άξονα των z, μπορούμε να φανταστούμε την κάθε ακτίνα να διατρέχει κάθετα (σταθερό z) τη στοίβα των εικόνων. Επομένως σε κάθε pixel της νέας εικόνας η τιμή της έντασης για κάθε χρώμα, αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή που εμφάνισε το κάθε χρώμα κατά μήκος του άξονα των z. Στην **Εικόνα Υ2-5** εμφανίζεται ένα παράδειγμα για την ένταση ενός μόνο χρώματος. Στην περίπτωση περισσότερων χρωμάτων ακολουθείται η ίδια διαδικασία, χωρίς να είναι απαραίτητο να ταυτίζονται τα επίπεδα που παρουσιάζεται το μέγιστο για τα διάφορα χρώματα.



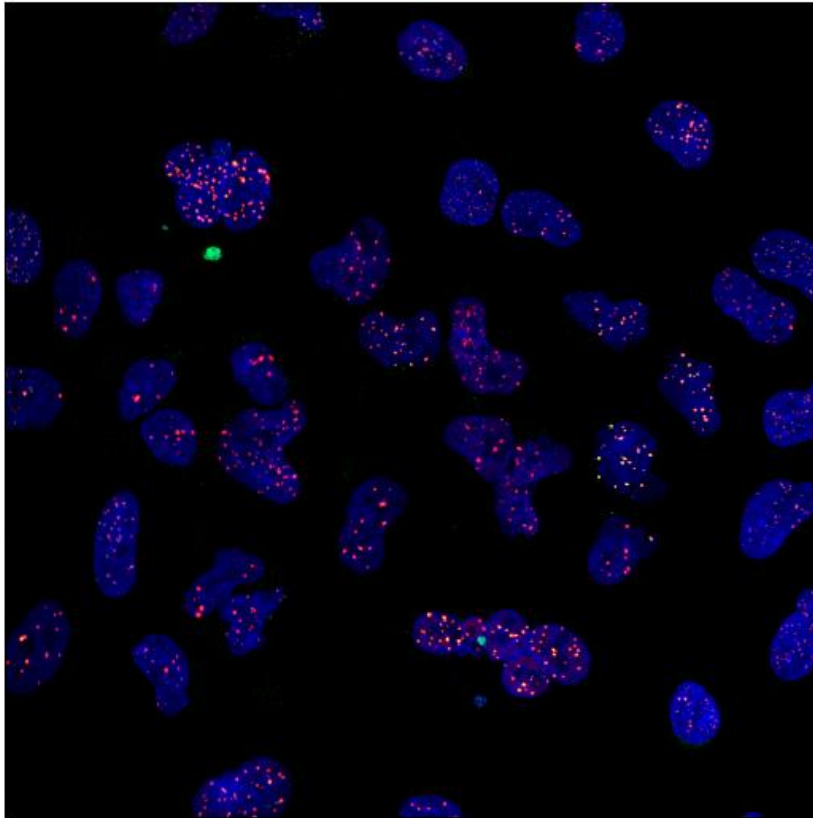
Εικόνα Υ2-5: Παράδειγμα για την ένταξη ενός μόνο χρώματος για τη διαδικασία της *MaximumIntensityProjection* κάθετα στον άξονα z. Πηγή: [https://en.wikibooks.org/wiki/Basic\\_Physics\\_of\\_Nuclear\\_Medicine/Three-Dimensional\\_Visualization\\_Techniques](https://en.wikibooks.org/wiki/Basic_Physics_of_Nuclear_Medicine/Three-Dimensional_Visualization_Techniques)

Προκειμένου να γίνει κατανοητό πώς μια εικόνα 3-D μετατρέπεται σε 2-D παρουσιάζεται παρακάτω ένα πλαίσιο εικόνων. **Εικόνα Υ2-6.** Μία σύνθετη εικόνα προερχόμενη από το ImageJ, μας επιτρέπει να παρουσιάσουμε το 3-D πακέτο δεδομένων ως 2-D, παρ' όλο που οι εικόνες σε κάθε πλαίσιο είναι αρκετά μικρές. Η διαδικασία αυτή γίνεται ακολουθώντας τα βήματα Image-> Stacks-> MakeMontage, όπου μπορεί να ορίσεις τον αριθμό των στηλών και των γραμμών, όπως παρουσιαστούν.



Εικόνα Υ2-6: Σύνθετη εικόνα (*montage*) 12 εικόνων 2-D. Οι εικόνες αυτές παρουσιάζουν τα επίπεδα από τα οποία αποτελείται η εικόνα 3-D.

Οι 2D εικόνες λοιπόν, που εμφανίζονται στο παραπάνω πλαίσιο, επεξεργάζονται μέσω την Maximum Intensity Projection και δημιουργείται η **Εικόνα Υ2-7**.



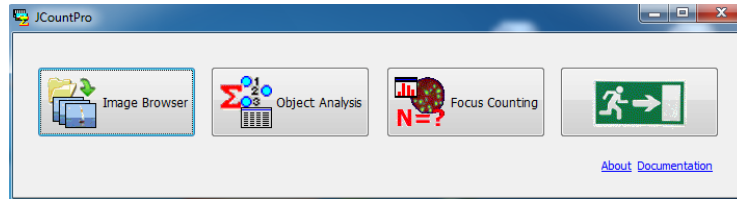
*Εικόνα Υ2-7: Παρουσίαση της εικόνας μέσω της MaximumIntensityProjection, των εικόνων,1-12, της σύνθετης εικόνα Υ2-6.*

### 2.2.2 Χρήση του λογισμικού JCountPro

Το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων JCount αναπτύχθηκε από τον δρ.α Pavel Lobachevsky (Peter McCallum Institute, Melbourne, Australia) και παραχωρήθηκε στην ομάδα του εργαστηρίου βλαβών DNA του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

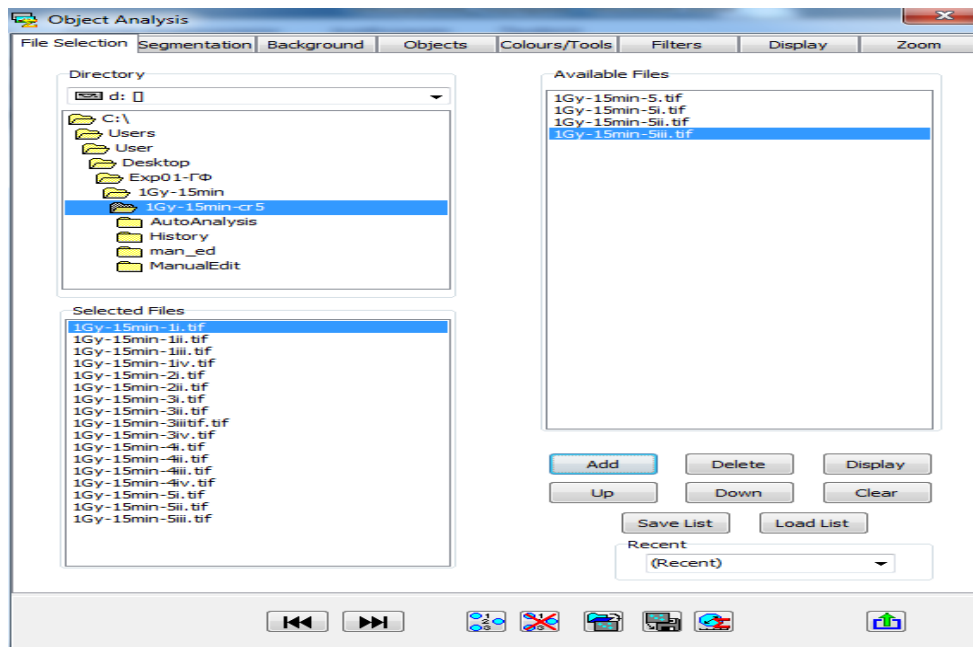
- Επιλέγουμε το *Object Analysis*. Αυτή η ενότητα αναγνωρίζει και αναλύει σχετικά μεγάλα αντικείμενα εντός μίας εικόνας. Αυτό το βήμα είναι προαπαιτούμενο για την αναγνώριση και μέτρηση των εστιών αργότερα, γιατί σε αυτό τίθενται οι περιοχές εντός των οποίων το πρόγραμμα θα ψάξει αυτά τα μικρότερα αντικείμενα. **ΕικόναΥ2-8.**

Η *Ανάλυση Αντικειμένων* παράγει για κάθε εικόνα ένα *Object Collection File* (Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων) το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην *Ανάλυση Εστιών* στη συνέχεια για την αναγνώριση και την καταμέτρηση των εστιών εντός των μεγάλων αντικειμένων. Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του για την ανάλυση αντικειμένων σε μία εικόνα.



Εικόνα Υ2-8: Αρχική οθόνη του JCountPro. Επιλέγεται το “ObjectAnalysis” (Ανάλυση Αντικειμένων), για την αναγνώριση των αντικειμένων μίας εικόνας

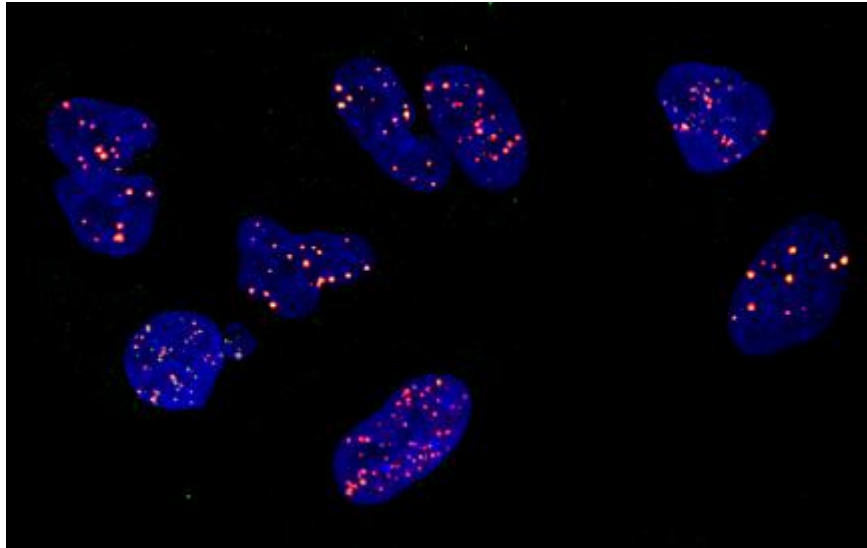
- Στην *File Selection* (Επιλογή Αρχείων) αναζητούμε το φάκελο με τις εικόνες τύπου .tif που έχουν δημιουργηθεί από το προηγούμενο βήμα μέσω του ImageJ και που θα αναλύσει το πρόγραμμα. Επιλέγοντάς τες, πατάμε στη συνέχεια το κουμπί *Add* (Προσθήκη). **Εικόνα Υ2-9**



Εικόνα Υ2-9: Στιγμιότυπο για την επιλογή των αρχείων. Επιλέγεται ο φάκελος με τις εικόνες τύπου .tif που έχουν δημιουργηθεί μέσω του ImageJ και που θα αναλύσει το πρόγραμμα

- Στη συνέχεια πατάμε *Display* (Έκθεση- ενν. εικόνων) και εμφανίζονται οι εικόνες που επιλέξαμε στο προηγούμενο βήμα, όπως είναι η παρακάτω. **Εικόνα Υ2-10**



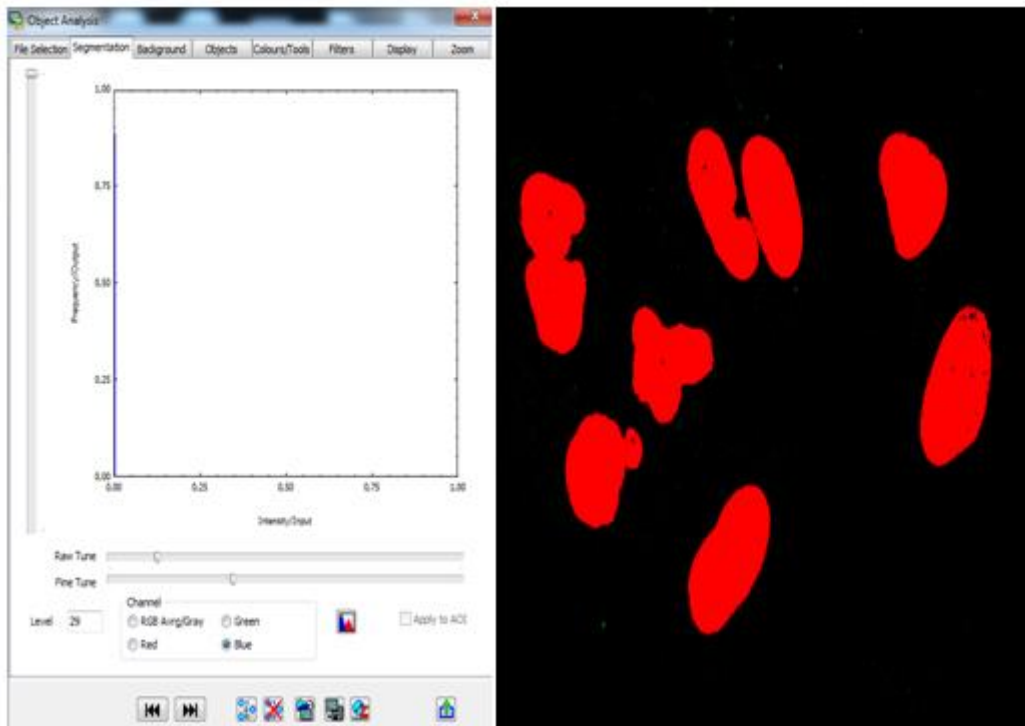


Εικόνα Υ2-10: Στιγμιότυπο μίας εικόνας τύπου .tif, η οποία εμφανίζεται έπειτα από την εντολή “Display” (Εκθεση)


Επιλέγουμε το *Segmentation* (Διαχωρισμός)-όπου είναι η δεύτερη καρτέλα της *Επεξεργασίας Αντικειμένων* και κάνουμε κλικ στο Channel Blue έτσι ώστε να οριστεί το χρώμα, σύμφωνα με το οποίο θα γίνει η επιλογή των αντικειμένων. Καθώς στο συγκεκριμένο πείραμα είχε χρησιμοποιηθεί η ουσία DAPI για τη χρώση των πυρήνων (αντικειμένων) το χρώμα είναι το μπλε. Το λογισμικό δίνει αυτήν τη δυνατότητα διότι εκτός από το DAPI, οι πυρήνες θα μπορούσαν λόγω χάρη να είχαν χρωστεί με PI<sup>6</sup>, που είναι κόκκινο. Υπάρχουν δύο μπάρες που ονομάζονται *Raw Tune* και *Fine Tune*. Αυτές χρησιμοποιούνται για να τεθεί το κατώφλι ή όριο διαχωρισμού. Με το *Raw Tune* θέτουμε το αρχικό κατώφλι. Αλλάζοντας την μπάρα του *Fine Tune* αυξάνουμε ή μειώνουμε την επιφάνεια διαχωρισμού λίγο, βάσει του τρέχοντος κατωφλίου, **Εικόνα Υ2-11**.

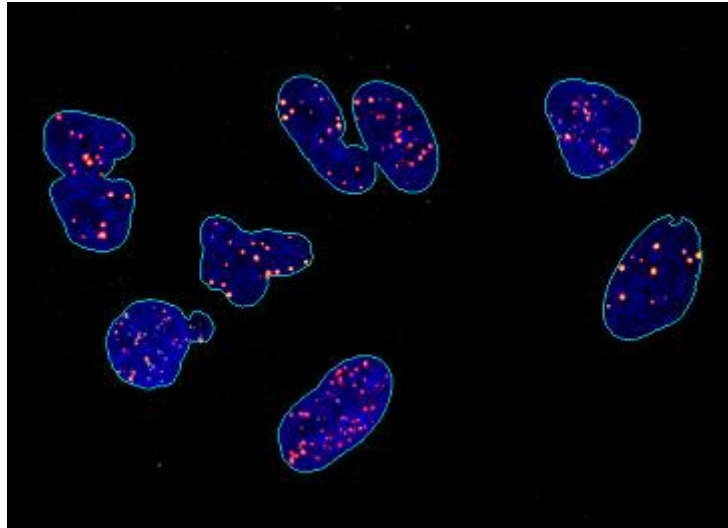
---

<sup>16</sup>PI: Propidium Iodide: Ιωδιούχο προπίδιο: χρωστική που επισημαίνει πυρήνες κυττάρων, διεγείρεται στα 535 nm και εκπέμπει στα 617 nm.



Εικόνα Υ2-11: Στιγμιότυπο της καρτέλας Segmentation (Διαχωρισμός)

- Έπειτα κλικάρουμε το κάτω αριστερά εικονίδιο “Identify Objects for current Image” (Αναγνώριση Αντικειμένων) (  ). Αυτό ανιχνεύει τα μεγάλα αντικείμενα στην εικόνα βασιζόμενη στις παραμέτρους διαχωρισμού που έχουμε θέσει. Τα ανιχνευμένα αντικείμενα εμφανίζονται σχεδιασμένα με ένα σύνορο ή περιγράμμα γύρω από την περιοχή. **Εικόνα Υ2-12**
- Με δεξί κλικ πάνω στην εικόνα εμφανίζονται διάφορα εργαλεία “Object Splitting Tools” ( Εργαλεία Χωρισμού Αντικειμένων) έτσι ώστε να επιτρέπεται χειροκίνητα περαιτέρω επεξεργασία.

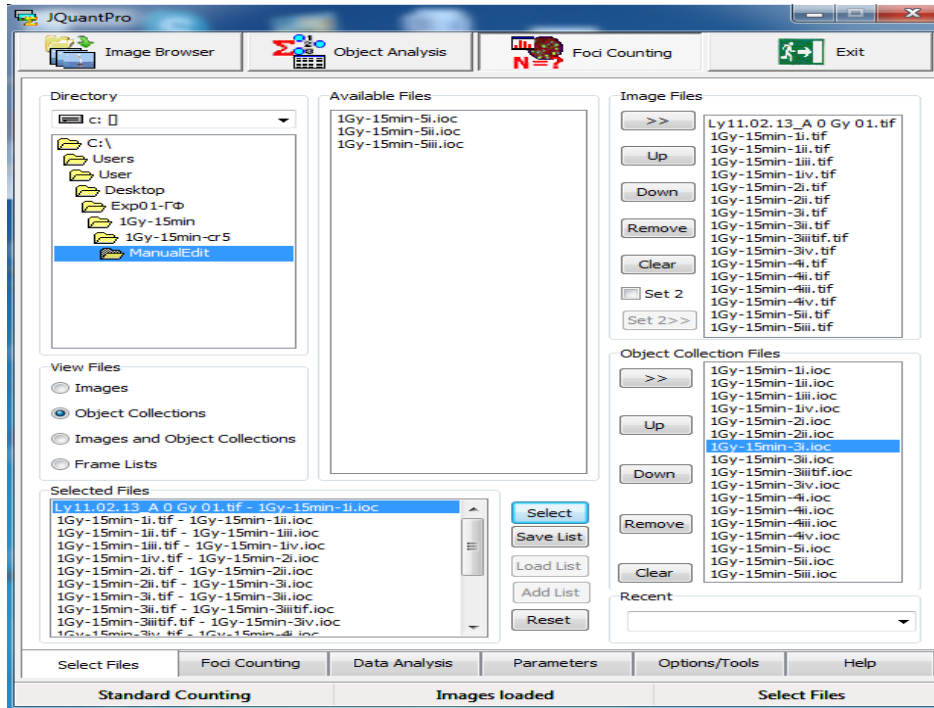


Εικόνα Υ2-12: Στιγμιότυπο των ανιχνεύσιμων αντικειμένων, με το χαρακτηριστικό περίγραμμα γύρω από την περιοχή.

### 2.2.3 Η χρήση του λογισμικού JQuantPlus

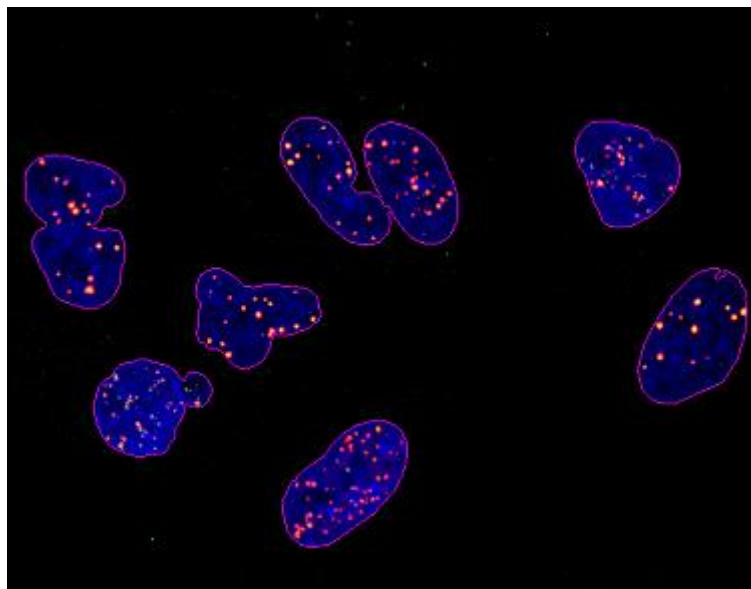
Η ανάλυση συνεχίζεται χρησιμοποιώντας το λογισμικό JQuantPlus ως μεταγενέστερης έκδοσης του JCountPro, το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των εστιών.

- Αρχικά, δουλεύουμε στην καρτέλα “ Foci Counting” (Μέτρηση Εστιών). **Εικόνα Υ2-13.** Στο πλαίσιο του “Directory” εμφανίζονται τα αρχεία που έχουμε. Στο πλαίσιο “View Files” (Εμφάνιση Αρχείων) επιλέγουμε το “Images” και επιλέγουμε όλες τις εικόνες που θέλουμε να δουλέψουμε τύπου .tif και τις προσθέτουμε στο αριστερό παράθυρο “Image Files” (Αρχείο Εικόνων). Στη συνέχεια, στο πλαίσιο “View Files” επιλέγουμε το “Object Collections” και τα προσθέτουμε στο αριστερό παράθυρο “Object Collection Files” (Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων) τα αντίστοιχα αρχεία τύπου .ios που δημιουργήθηκαν στο προηγούμενο βήμα. Προσοχή πρέπει να δοθεί έτσι ώστε τα αρχεία Εικόνων και Συλλογής Αντικειμένων να είναι σωστά αντιστοιχισμένα ένα προς ένα στα δύο πλαίσια.



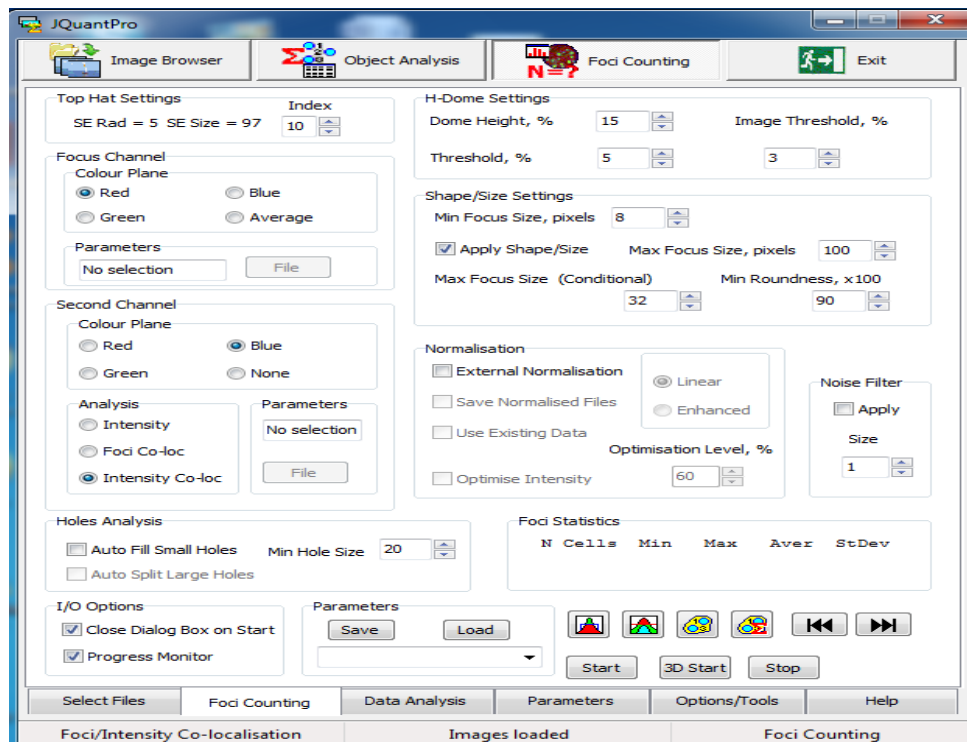
Εικόνα Υ2-13: Αρχική οθόνη του JQuantPlus στην καρτέλα “Foci Counting” (Μέτρηση εστιών)

Αφού έχει ολοκληρωθεί η λίστα με τα αρχεία εικόνων και συλλογής αντικειμένων επιλέγοντας το κουτί “Select” (Επιλογή), ανοίγει η περιήγηση εικόνων για να ξεκινήσει η ανάλυση των εστιών στις επόμενες καρτέλες. **Εικόνα Υ2-14**




Εικόνα Υ2-14: Ενδεικτικό στιγμιότυπο μετά την επιλογή των εικόνων για περιήγηση.

- Στη συνέχεια, επιλέγουμε την καρτέλα “Foci Counting” (Μέτρηση Εστιών). Παρατίθεται ενδεικτικά ένα στιγμιότυπο της καρτέλας με τις ορισμένες παραμέτρους. **Εικόνα Υ2-15**




Εικόνα Υ2-15: Ενδεικτικό στιγμιότυπο των ορισμένων παραμέτρων στην καρτέλα FociCounting.

Μερικές πληροφορίες σχετικά με τις παραμέτρους που ορίστηκαν παρατίθενται παρακάτω συνοπτικά.

-  Top-Hat Transformation (Μετασχηματισμός Top-Hat):

Τονίζει μικρά στοιχεία και λεπτομέρειες στην εικόνα, καθώς επίσης βοηθάει στην απομόνωση μεμονωμένων εστιών. Η βασική παράμετρος του μετασχηματισμού είναι το μέγεθος σε pixel του Δομικού Στοιχείου. Αν οι φωτεινές περιοχές έχουν αντίστοιχο μέγεθος με το τελευταίο, τότε ενισχύονται. Αν έχουν μικρότερες τότε επηρεάζονται ελάχιστα, ενώ αν είναι μεγαλύτερες χάνονται από την εικόνα.

Για να γίνει ο μετασχηματισμός επιλέγουμε το κουμπί  κάτω στο παράθυρο και δημιουργείται μία καινούρια εικόνα από την αρχική.

-  H-Dome Segmentation (Διαχωρισμός H-Dome):

Διαχωρίζει τις περιοχές των εστιών. Χρειάζεται δύο παραμέτρους: Dome Height (Ύψος Θόλου) και Threshold (Κατώφλι). Η μέθοδος βασίζεται στα επίπεδα της έντασης ενός καναλιού. Εξετάζεται κάθε κορυφή στο ιστόγραμμα και υπολογίζει ένα ποσοστό του μήκους αρχίζοντας από το μέγιστο σημείο με τη χρήση της παραμέτρου Ύψος Θόλου. Τα pixel που πέφτουν εντός αυτών των επιπέδων έντασης τονίζονται στην εικόνα. Η παράμετρος του Κατωφλίου λειτουργεί ως τελικός περιοριστικός παράγοντας και μόνο τα pixel που βρίσκονται εντός του εύρους αυτού μένουν στην εικόνα.

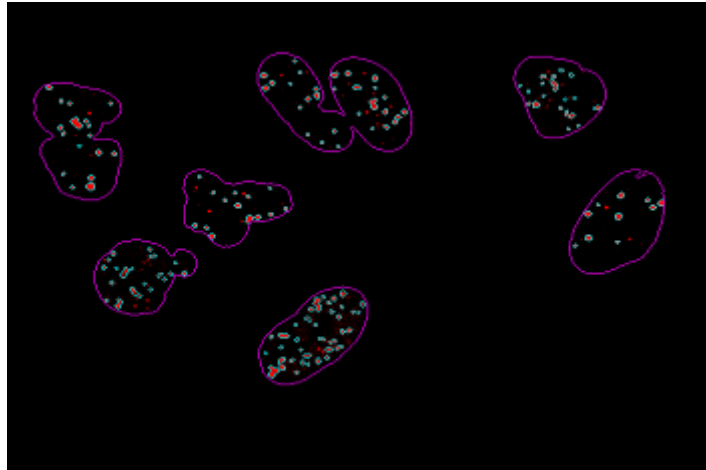
- Ο μετασχηματισμός εφαρμόζεται σε ένα μόνο χρώμα της RGB εικόνας. Στο πλαίσιο του Focus Channel (Κανάλι Εστιών) επιλέγουμε το κανάλι με χρώμα red και στη συνέχεια green, για τις διαφορετικές πρωτεΐνες όπου θα αναλυθεί στην Ανάλυση Εστιών.

Για να εκτελεστεί ο Μετασχηματισμός H-Dome, ο χρήστης πατάει το κουμπί  στο κάτω μέρος του παραθύρου.

#### Identify Foci (Αναγνώριση Εστιών) :

- Αυτή η διαδικασία θα αναγνωρίσει περιοχές με foci βασιζόμενη στο διαχωρισμό που έχει γίνει από τον Διαχωρισμό H-Dome.
- Στο πλαίσιο Apply Shape/ Size (Εφαρμογή Σχήματος/ Μεγέθους) ορίζουμε στο Min Focus Size ( Ελάχιστο Μέγεθος Focus) το ελάχιστο επιτρεπτό μέγεθος της εστίας σε pixel. Κάθε εστία μικρότερη από αυτή θα αφαιρείται.
- Στο πλαίσιο Second Channel ( Δεύτερο Κανάλι), επιλέγουμε το δευτερεύον χρώμα ανάλυσης, εδώ το μπλε.
- Στο κάτω πλαίσιο Analysis (Ανάλυση) επιλέγουμε την επιλογή Intensity Co-loc (Συνεντοπισμός Έντασης), όπου υπολογίζει τη σχετική ένταση του δευτερεύοντος χρώματος εντός των εστιών του πρώτου χρώματος. Αυτή δίνει τον συντελεστή Pdc, που ορίζεται ως ο μέσος όρος της μέσης έντασης που εκδηλώνει κάθε εστία του πρώτου καναλιού στο δευτερεύον κανάλι προς την μέση ένταση του υπόλοιπου πυρήνα στο δευτερεύον κανάλι.

Παρατίθεται ενδεικτικά ένα στιγμιότυπο της ανάλυσης της **Εικόνας Υ2-16** εφόσον έχουν οριστεί όλες οι προαπαιτούμενες παράμετροι.



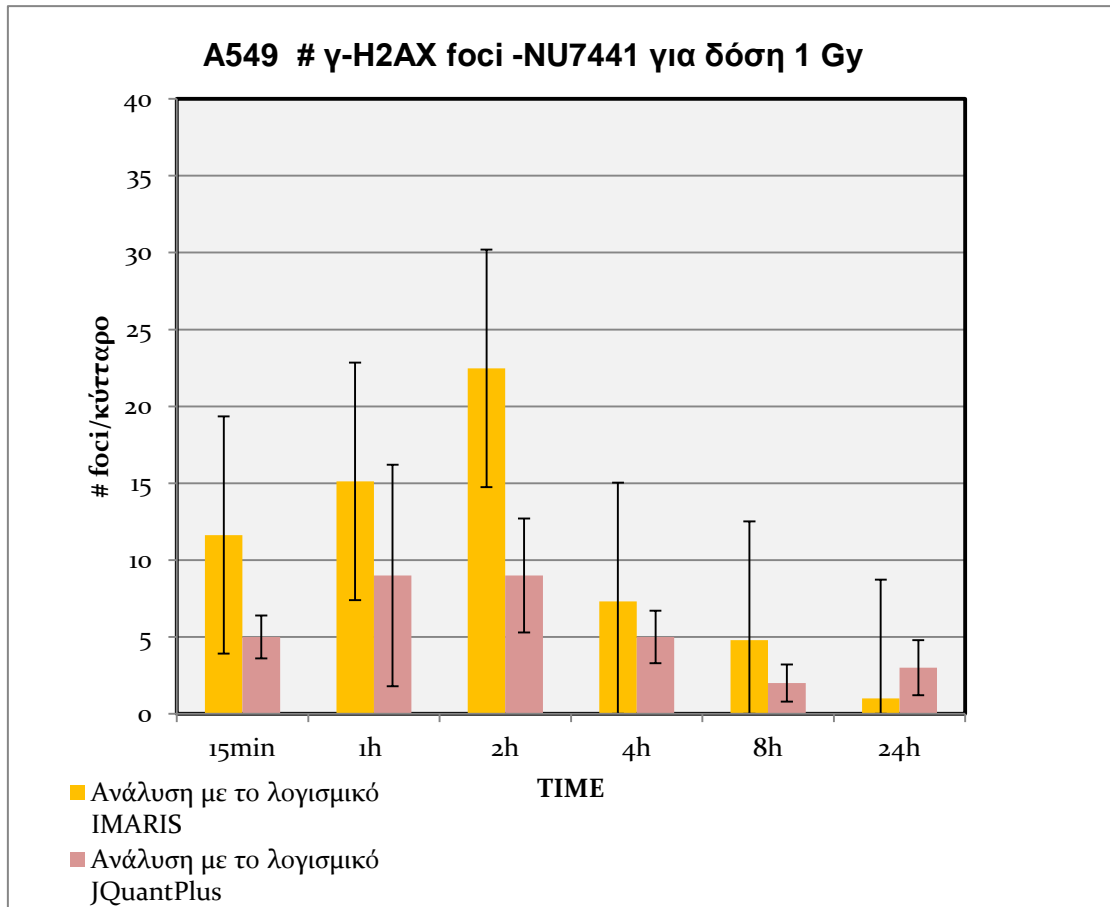
Εικόνα Υ2-16: Στιγμιότυπο της οθόνης, έπειτα από τον ορισμό των παραμέτρων και την τελική οδό για τη μέτρηση των foci.

- Πολύ σημαντικό είναι να κατανοηθεί πως οι παράμετροι ανάλυσης μιας εικόνας, μπορεί να αλλάζουν σύμφωνα με αυτό που μελετάμε. Για παράδειγμα, εφόσον μας ενδιαφέρει να μετρήσουμε σωστά τα foci/cell τότε θέλουμε κριτήρια για το *darpi* πολύ ελαστικά, ώστε να περιέχονται με βεβαιότητα όλα τα foci. Τα κριτήρια είναι λοιπόν κάθε φορά διαφορετικά για κάθε εικόνα. Τα κριτήρια αλλάζουν ώστε να είναι δίκαιο και σωστό αυτό που ψάχνουμε. Αφού βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι, η αυτόματη μέτρηση γίνεται πατώντας το κουμπί Start (Εκκίνηση) στο κάτω μέρος του παραθύρου.
- Τα αποτελέσματα τοποθετούνται στα φύλλα εργασίας FociAnalysis (Ανάλυση Εστιών), Cell Summary (Σύνοψη Κυττάρου) και Focus Summary (Σύνοψη Focus). Στη συγκεκριμένη μελέτη, παίρνουμε τα δεδομένα που εμφανίζονται στην καρτέλα Foci Analysis στην στήλη Average Foci Number (Μέσος Όρος του αριθμού των foci).

## 2.3 Υπολογιστικά Αποτελέσματα

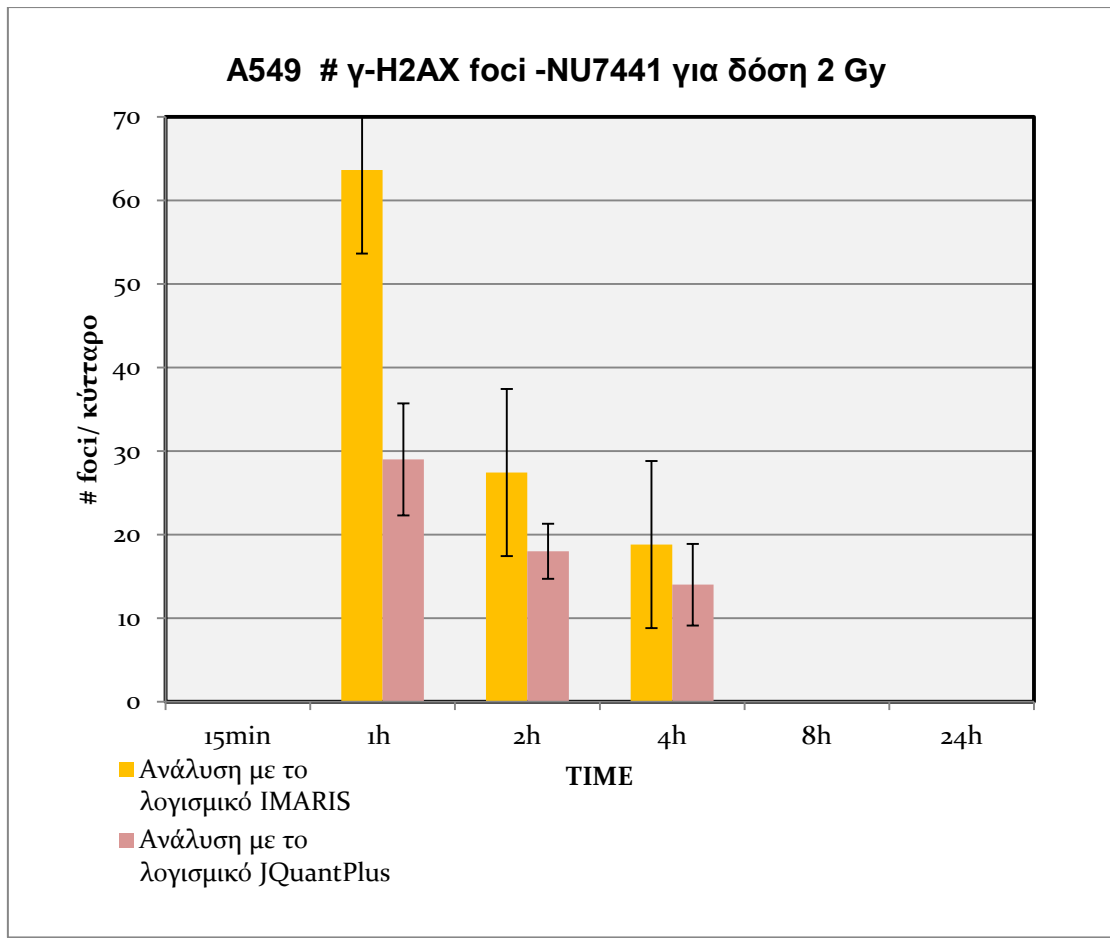
Μετά την μετατροπή των εικόνων σε 2-D και τον ορισμό των βέλτιστων παραμέτρων στα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στη 2<sup>η</sup> μελέτη, έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα.

Αρχικά παρουσιάζεται το γράφημα για τον αριθμό των επαγόμενων εστιών της πρωτεΐνης γH2AX για 1 Gy και στη συνέχεια το γράφημα για 2 Gy, συγκριτικά με τα δύο λογισμικά ανάλυσης, **Γράφημα 2-1** και **Γράφημα 2-2**.



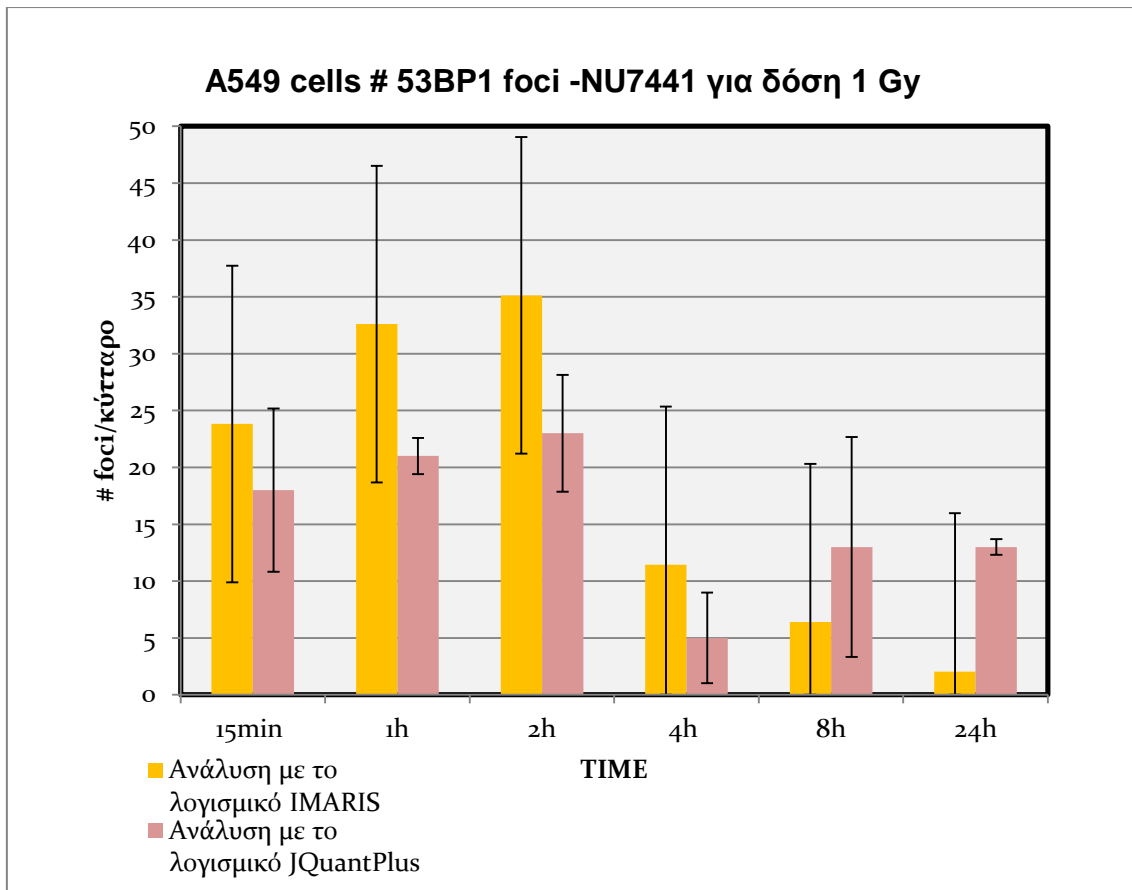
Γράφημα 2-1: Επαγόμενες εστίες φθορισμού ανά κύτταρο της πρωτεΐνης  $\gamma$ H2AX στην πορεία του χρόνου για δόση 1 Gy για κύτταρα A549, μέσω του λογισμικού IMARIS με το κίτρινο χρώμα και μέσω του λογισμικού JQuantPlus με το ροζ χρώμα, χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441.



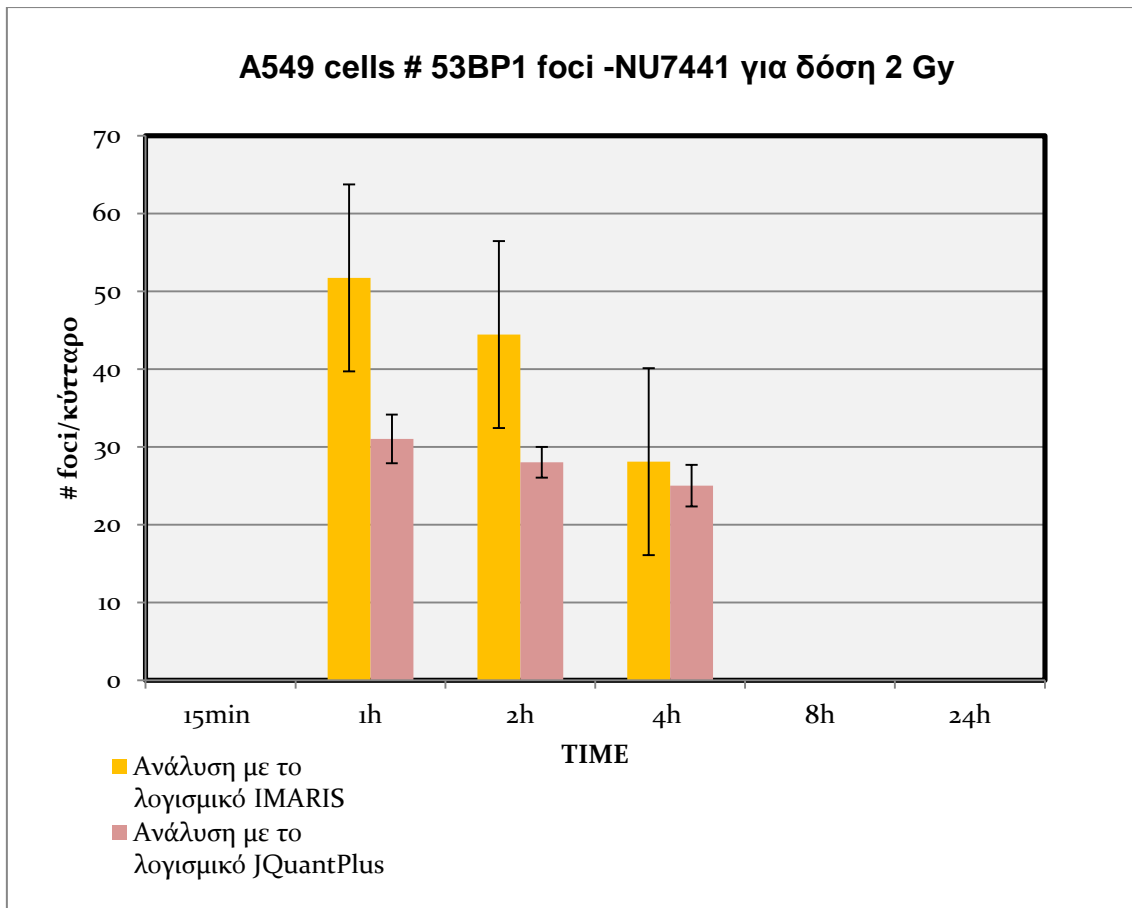


Γράφημα 2-2: Επαγόμενες εστίες φθορισμού ανά κύτταρο της πρωτεΐνης  $\gamma$ H2AX στην πορεία του χρόνου για δόση 2 Gy για κύτταρα A549, μέσω του λογισμικού IMARIS με το κίτρινο χρώμα και μέσω του λογισμικού JQuantPlus με το ροζ χρώμα, χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το γράφημα για τον αριθμό των επαγόμενων εστιών της πρωτεΐνης 53BP1 για 1 Gy και ακολουθεί το γράφημα για 2 Gy, συγκριτικά με τα δύο λογισμικά ανάλυσης, **Γράφημα 2-3** και **Γράφημα 2-4**



Γράφημα 2-3: Επαγόμενες εστίες φθορισμού ανά κύτταρο της πρωτεΐνης 53BP1 στην πορεία του χρόνου για δόση 1 Gy για κύτταρα A549, μέσω του λογισμικού IMARIS με το κίτρινο χρώμα και μέσω του λογισμικού JQuantPlus με το ροζ χρώμα, χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441.



Γράφημα 2-4: Επαγόμενες εστίες φθορισμού ανά κύτταρο της πρωτεΐνης 53BP1 στην πορεία του χρόνου για δόση 2 Gy για κύτταρα A549, μέσω του λογισμικού IMARIS με το κίτρινο χρώμα και μέσω του λογισμικού JQuantPlus με το ροζ χρώμα, χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU7441.

## 2.4 Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα

Σχετικά με τον αριθμό των επαγόμενων εστιών της πρωτεΐνης γH2AX:

Τόσο για τη δόση των 1 Gy όσο και για τη δόση των 2 Gy, παρατηρείται ότι και με τα δύο λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, ο επαγόμενος αριθμός εστιών ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά με εξαίρεση στη δόση 1 Gy στις 24h. Ακόμα, στο σημείο όπου παρατηρείται ο μέγιστος αριθμός εστιών, δηλαδή στις 2h για 1 Gy και στη 1h για 2 Gy, οι δύο μέθοδοι ανάλυσης παρουσιάζουν σημαντική διαφορά εκτός ορίων σφάλματος, ενώ στα υπόλοιπα χρονικά σημεία και στις δύο δόσεις, οι διαφορές είναι μεγάλες αλλά εντός των τυπικών αποκλίσεων που έχουν οριστεί από την κάθε ανάλυση αντίστοιχα.

Σχετικά με τον αριθμό των επαγόμενων εστιών της πρωτεΐνης 53BP1:

Παρόμοια συμπεριφορά με την πρωτεΐνη  $\gamma$ H2AX παρουσιάζει και η 53BP1. Για τη δόση των 1Gy, παρατηρείται ότι και με τα δύο λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, ο επαγόμενος αριθμός εστιών ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά με εξαίρεση τις 8h και τις 24h, ενώ για τη δόση των 2 Gy ο επαγόμενος αριθμός εστιών ακολουθεί την ίδια ακριβώς συμπεριφορά για όλες τις χρονικές στιγμές. Επιπλέον, στο σημείο όπου παρατηρείται ο μέγιστος αριθμός εστιών για τη δόση των 2 Gy στη 1h, οι δύο μέθοδοι ανάλυσης παρουσιάζουν σημαντική διαφορά εκτός ορίων σφάλματος, ενώ στα υπόλοιπα χρονικά σημεία και στις δύο δόσεις, οι διαφορές είναι μεγάλες αλλά εντός των τυπικών αποκλίσεων που έχουν οριστεί από την κάθε ανάλυση αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι οι τιμές του πλήθους των εστιών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο μεθόδων ανάλυσης με τα αντίστοιχα λογισμικά IMARIS και JQuantPlus. Αξιοσημείωτο, πως μόνο στις περιπτώσεις που ο αριθμός των foci των  $\gamma$ H2AX και 53BP1 παρουσιάζει αντίστοιχα μέγιστη τιμή, η απόκλιση των δύο μεθόδων είναι εκτός ορίων σφάλματος.

Αρχικά, να τονιστεί πως η ανάλυση των εστιών με το IMARIS αφορούσε 3-D εικόνες, ενώ η ανάλυση με τα λογισμικά αφορούσε 2-D εικόνες, με αποτέλεσμα πιθανόν το περιορισμό του όγκου των δεδομένων προς ανάλυση. Επιπλέον, η μετατροπή των εικόνων σε 2-D μέσω της MIP ενδεχομένως περιόρισε σε σημαντικό βαθμό τον προσδιορισμό των εστιών.

Η MIP δε μπορεί να μεταδώσει και να εμφανίσει σχέσεις βάθους μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων της στοίβας. Ακόμα, δε μπορεί να παρουσιάσει επικαλυπτόμενες δομές (εδώ οι εστίες foci) όσο μία εστία αυξάνει την αδιαφάνεια της. Ακριβώς επειδή μία εικόνα προερχόμενη από επεξεργασία MIP δεν έχει αποχρώσεις και σκιάσεις, χάνεται η πληροφορία βάθους και η εικόνα στενεύει.

Ακόμα, στη μέθοδο αυτή ο όγκος των δεδομένων δεν είναι ενσωματωμένος κατά μήκος της κατεύθυνσης προβολής της ακτίνας. Έτσι μόνο η μέγιστη τιμή που συναντάται κατά μήκος της ακτίνας συμβάλει στην τελική εικόνα. Δηλαδή ακόμα και στην περίπτωση που τα foci είναι πολλά, όπως και έχει σημειωθεί στις παρατηρήσεις πιο πάνω, η μέθοδος αδυνατεί να τα λάβει όλα υπόψιν και έτσι χάνεται σημαντικός αριθμός πλήθους των επαγόμενων εστιών τόσο στην πρωτεΐνη  $\gamma$ H2AX όσο και στην πρωτεΐνη 53BP1. Συμπερασματικά, η ανάλυση εικόνων 2D μέχρι τις 20 εστίες ή μέχρι το 1Gy μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη.

## Βιβλιογραφία

1. Performing Maximum Intensity Projection with the Visualization Toolkit, Stefan Bruckner\*Seminar Paper The Institute of Computer Graphics and Algorithms Vienna University of Technology, Austria

## Κεφάλαιο 7

### 3<sup>η</sup> μελέτη: Συνεντοπισμός επαγόμενων εστιών φθορισμού 53BP1 και γH2AX

#### 3.1 Σκοπός

Σκοπός της ανάλυσης αυτής είναι να ανιχνευθεί ο συνεντοπισμός μεταξύ των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων, γH2AX και 53BP1, σε καρκινικά κύτταρα A549, τα οποία έχουν εκτεθεί σε ακτίνες-Χ. Αυτό θα γίνει μέσω της παραμέτρου Pclc.

Η οπτικοποίηση των δίκλωνων θραύσεων εκφράζεται ως το συνεντοπισμένο σήμα φθορισμού το οποίο προέρχεται από τα φθορίζοντα αντισώματα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης αυτών (ΔΚΘ), γH2AX ή 53BP1. Εκτενής αναφορά για την παράμετρο Pclc γίνεται στην παράγραφο 5.8.

Ως γεγονότα συνεντοπισμού -γH2AX to 53BP1- εννοούμε τις εστίες οι οποίες έχουν τα χαρακτηριστικά των εστιών 53BP1 πρωτίστως, και επιπλέον έχουν σήμα στο κανάλι των εστιών γH2AX. Πρόκειται δηλαδή για εστίες 53BP1 που έχουν πάνω τους γH2AX. Αντίστοιχα, ως γεγονότα συνεντοπισμού -53BP1 to γH2AX – εννοούμε τις εστίες οι οποίες έχουν τα χαρακτηριστικά των εστιών γH2AX πρωτίστως, και επιπλέον έχουν σήμα στο κανάλι των εστιών 53BP1.

Το χρώμα του 53BP1 σε αυτό το πείραμα είναι το κόκκινο channel=3 ενώ του γH2AX είναι το πράσινο channel=2.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, σύμφωνα με τη διατριβή της Ζ.Νικητάκη, για την εκτίμηση του συνεντοπισμού χρησιμοποιούμε το κριτήριο-παράμετρο Pclc που ορίζεται ως:

$$Pclc = \frac{M.O \text{ (μέσης έντασης στο πράσινο για την κόκκινη εστία}_i)}{\frac{\text{ολική ένταση στο πράσινο όλου του πυρήνα} - \sum_i \text{ολική ένταση στο πράσινο για την κόκκινη εστία}_i}{\text{όγκος του πυρήνα} - \sum_i \text{όγκος της κόκκινης εστίας}_i}}$$

(E.3-1)

#### 3.2 Μεθοδολογία για υπολογισμό του Pclc

Για το κάθε πειραματικό σημείο, ήταν διαθέσιμες 5 εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο, συνοδευμένες με ισάριθμα φύλλα του MSExcel. Κάθε ένα από αυτά περιέχει 160 καρτέλες

Μέσω των φύλλων excel από το IMARIS:

Για να υπολογίσουμε την παράμετρο συνεντοπισμού των γH2AX εστιών πάνω στις 53BP1 εστίες (" Pcl<sub>c</sub> γH2AX over the 53BP1 foci"):

- Ο αριθμητής του κλάσματος της **Εξίσωσης E.3-1** υπολογίζεται από την καρτέλα με όνομα "Vesicles 53BP1 Intensity Mean ch=2", που είναι η καρτέλα που δίνει τη μέση ένταση των εστιών 53BP1, στο πράσινο χρώμα (για το συγκεκριμένο λογισμικό ορισμένο ως «channel 2»). Υπενθυμίζεται ότι οι ίδιες οι εστίες 53BP1 είναι στο συγκεκριμένο πείραμα επισημασμένες με κόκκινο χρώμα.

Οι υπολογισμοί έγιναν με το MSExcel και οι εντολές που ακολουθήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

DATA→ Subtotal→ At each change in CELLID, η οποία εξασφαλίζει ότι για τον υπολογισμό της μίας τιμής θα ληφθούν υπόψιν οι εστίες ενός μόνο κυττάρου, καθώς ο δείκτης "CellID" έχει την ίδια τιμή για κάθε εστία που περιέχεται στο ίδιο κύτταρο.

Use function AVERAGE, όπου υπολογίζει το μέσο όρο.

Add subtotal to VALUE, η οποία εξασφαλίζει ότι η συνάρτηση θα εφαρμοστεί στη στήλη "Value".

- Ορίζουμε ως παρανομαστή το κλάσμα  $\frac{A-B}{\Gamma-\Delta}$  :

A = η ολική ένταση του πυρήνα στο πράσινο, λαμβάνεται από την καρτέλα "Cell cytoplasm Intensity Sum ch=2",

B = το άθροισμα πάνω σε κάθε κόκκινο αντικείμενο της ολικής έντασης στο πράσινο (του κάθε αντικειμένου) προκύπτει από την καρτέλα "Vesicles 53BP1 Intensity Sum ch=2", η οποία δίνει την ολική ένταση κάθε εστίας 53BP1 στο πράσινο χρώμα. Για να εκφραστεί το αποτέλεσμα «ανά κύτταρο» ακολουθείται η εξής επεξεργασία:

DATA→Subtotal→At each change in CELLID  
Use function SUM  
Add subtotal to VALUE

Γ = ο όγκος του πυρήνα για κάθε κύτταρο, ο οποίος δίνεται στην καρτέλα "Cell number of voxels",

Δ = το άθροισμα των όγκων των κόκκινων αντικειμένων, ο οποίος δίνεται από την καρτέλα "Vesicles 53BP1 Number of voxels", με την εξής επεξεργασία:

DATA→ Subtotal→ At each change in CELLID

Use function   
Add subtotal to

Αντίστοιχα, ο υπολογισμός της Παραμέτρου Συνεντοπισμού των 53BP1 εστιών πάνω στις γH2AX εστίες "Pdc 53BP1 over the γH2AX foci" γίνεται με όμοιο τρόπο αντικαθιστώντας τα 53BP1 με γH2AX και το ch=2 με το ch=3:

- Ο αριθμητής του κλάσματος της εξίσωσης E.3-1 υπολογίζεται από την καρτέλα με όνομα "Vesicles γH2AX Intensity Mean ch=3", που είναι ηκαρτέλα που δίνει τη μέση ένταση των εστιών γH2AX, στο κόκκινο χρώμα (για το συγκεκριμένο λογισμικό ορισμένο ως «channel 3»).
- Ορίζουμε ως παρανομαστή το κλάσμα  $\frac{A-B}{\Gamma-\Delta}$

A = η ολική ένταση του πυρήνα στο κόκκινο, λαμβάνεται από την καρτέλα "Cell cytoplasm Intensity Sum ch=3",

B= το άθροισμα πάνω σε κάθε πράσινο αντικείμενο της ολικής έντασης στο κόκκινο (του κάθε αντικειμένου), προκύπτει από την καρτέλα " Vesicles γH2AX Intensity Sum ch=3" ", η οποία δίνει την ολική ένταση κάθε εστίας γH2AX στο κόκκινο χρώμα. Για να εκφραστεί το αποτέλεσμα «ανά κύτταρο» ακολουθείται η εξής επεξεργασία:

DATA → Subtotal → At each change in   
Use function   
Add subtotal to

Γ= ο όγκος του πυρήνα για κάθε κύτταρο, ο οποίος δίνεται στην καρτέλα "Cell number of voxels",

Δ= το άθροισμα των όγκων των πράσινων αντικειμένων, ο οποίος δίνεται από την καρτέλα :

" Vesicles γH2AX number of voxels ", με την εξής επεξεργασία:

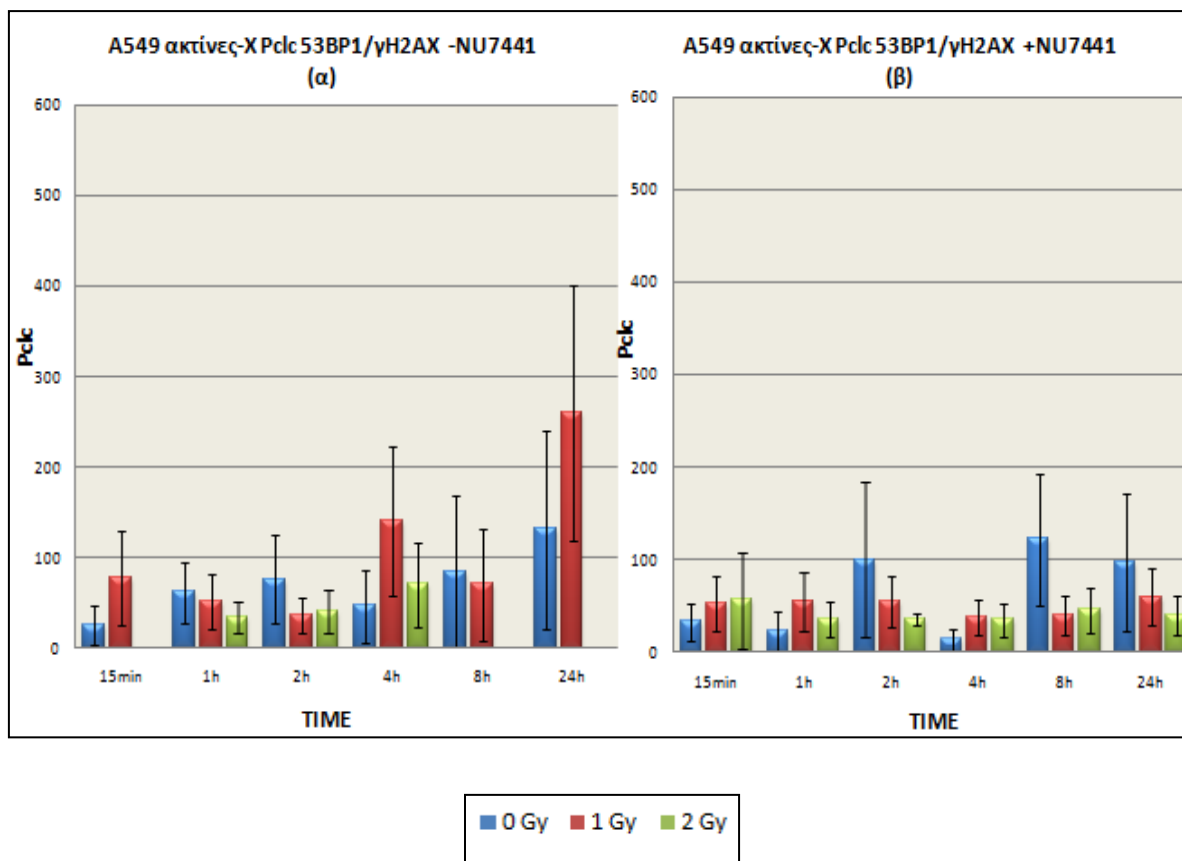
DATA → Subtotal → At each change in   
Use function   
Add subtotal to

Όπου υπάρχει παρουσία αναστολέα επιδιόρθωσης (inhibitor) πριν την ακτινοβολήση των κυττάρων εμφανίζεται ως, +NU, ενώ το -NU όταν δεν υπάρχει αναστολέας.

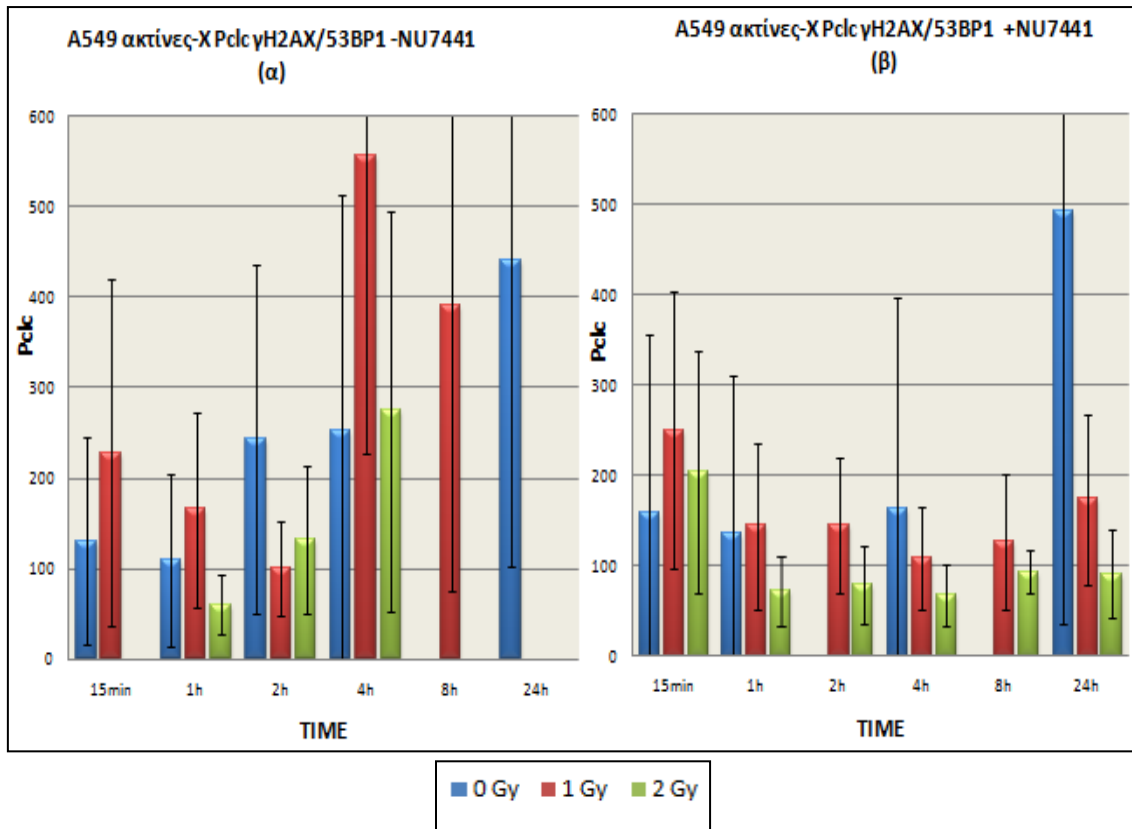


### 3.3 Υπολογιστικά Αποτελέσματα

Ακολουθεί η ανάλυση της μελέτης συνεντοπισμού των πρωτεϊνών και παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα. Οι πίνακες των αριθμητικών δεδομένων δίνονται στο παράρτημα, στο τέλος της 3ης μελέτης.



Γράφημα 3-1: Μελέτη συνεντοπισμού των 53BP1 εστιών πάνω στις γH2AX εστίες ("PclC 53BP1 over the γH2AX foci"), για την ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες- X. Στο (α) δεν υπάρχει αναστολέας επιδιόρθωσης NU 7441, ενώ στο (β) έχει προστεθεί αναστολέας NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο PclC.



Γράφημα 3-2 : Μελέτη συνεντοπισμού των γH2AXεστιών πάνω στις 53BP1 εστίες (“PclC γH2AX over the 53BP1 foci”), για την ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες- Χ. Στο (α) δεν υπάρχει αναστολέας επιδιόρθωσης NU 7441, ενώ στο (β) έχει προστεθεί αναστολέας NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο PclC.

### 3.4 Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα

Σχετικά με την περιγραφή των γραφημάτων. Συγκεκριμένα:

#### Χωρίς αναστολέα.

Για 0 Gy, το Pclc της 53BP1 πάνω στην γH2AX έχει μία ανοδική τάση με την πάροδο του χρόνου, παρουσιάζοντας όμως ελάχιστο στις 4h. Αντίστοιχα, το Pclc της γH2AX πάνω στην 53BP1 έχει ανοδική τάση με ελάχιστο να παρατηρείται στη 1h. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι οι τιμές του Pclc της γH2AX πάνω στη 53BP1 είναι μεγαλύτερες της τιμής του Pclc της 53BP1 πάνω στη γH2AX για όλες τις τιμές των δόσεων. Στα 15min διαφέρουν περίπου κατά 81%, στη 1h κατά 45% ενώ στις 24h κατά 70%. Για 1 Gy, το Pclc της 53BP1 πάνω στην γH2AX αρχικά μειώνεται, αυξάνεται στις 4 h, μειώνεται στο μισό στις 8h και συνέχεια παρουσιάζει αύξηση με το μέγιστο της στις 24h. Το Pclc της γH2AX πάνω στην 53BP1 αρχικά μειώνεται παρουσιάζοντας ελάχιστο στις 2h, στη συνέχεια αυξάνεται και μειώνεται τελικά στις 8h. Στα 15 min διαφέρουν περίπου κατά 65%, στη 1h κατά 69% ενώ για την ακραία τιμή των 8h διαφέρουν περίπου κατά 82%. Για 2 Gy, το Pclc της 53BP1 πάνω στην γH2AX όπως και το Pclc της γH2AX πάνω στην 53BP1 έχουν καθαρά ανοδική τάση με την πάροδο του χρόνου. Στη 1h διαφέρουν περίπου κατά 45% και για την υπάρχουσα ακραία των 4h διαφέρουν κατά 75%.

#### Με αναστολέα.

Για 0 Gy, το Pclc της 53BP1 πάνω στην γH2AX αυξομειώνεται συνεχώς με την πάροδο του χρόνου παρουσιάζοντας ελάχιστο στις 4h. Αντίστοιχα, το Pclc της γH2AX πάνω στην 53BP1, έχει μια μικρή πτώση από την έναρξη της ακτινοβολήσης στη 1h και στη συνέχεια αυξάνεται παρουσιάζοντας μέγιστο στις 24h. Όπως και στην περίπτωση της απουσίας του αναστολέα, οι τιμές του Pclc της γH2AX πάνω στη 53BP1 είναι μεγαλύτερες της τιμής του Pclc της 53BP1 πάνω στη γH2AX για όλες τις τιμές των δόσεων. Στα 15min διαφέρουν περίπου κατά 79%, στη 1h κατά 82% ενώ στις 24h κατά 80%. Για 1Gy, το Pclc της 53BP1 πάνω στην γH2AX, από τα 15min μέχρι τις 2h παραμένει σχεδόν ίδιο με μικρές διαφορές στις τιμές, μειώνεται στις 4h όπου και παρουσιάζει το ελάχιστο, ενώ στη συνέχεια αυξάνεται με μέγιστη τιμή στις 24h. Το Pclc της γH2AX πάνω στην 53BP1 αρχικά μειώνεται αρκετά μέχρι τις 4h όπου και παρουσιάζει ελάχιστο, ενώ στη συνέχεια έχει ανοδική τάση. Στα 15min διαφέρουν περίπου κατά 79%, στη 1h κατά 62% ενώ στις 24h κατά 66%. Για 2 Gy, το Pclc της 53BP1 πάνω στην γH2AX αρχικά μειώνεται παρουσιάζοντας ελάχιστο στις 4h και στη συνέχεια ακολουθεί αύξηση. Το Pclc της γH2AX πάνω στην 53BP1 ξεκινώντας με μία μεγάλη τιμή στα 15 min μειώνεται μέχρι τις 4h όπου παρουσιάζει το ελάχιστο και στη συνέχεια αυξάνεται. Στα 15min διαφέρουν περίπου κατά 73%, στη 1h κατά 50% ενώ στις 24h κατά 56%. Η πρώτη ιδέα

που μας δίνουν είναι ότι τα Pdc σε όλα τα διαγράμματα είναι πολύ μεγαλύτερα του 1. Άρα έχουμε «αληθινό» συνεντοπισμό. Αυτό δείχνει δηλαδή ότι οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό, γεγονός αναμενόμενο καθώς και οι δύο πρωτεΐνες που εξετάζουμε είναι από τον ίδιο επιδιορθωτικό μηχανισμό. Δηλαδή οι 53BP1 και γH2AX, αλληλεπιδρούν φυσικά μετά από ιοντίζουσα ακτινοβολία, υποδηλώνοντας ότι το 53BP1 μετακινείται στις θέσεις των δίκλωνων θραύσεων DNA σε απόκριση της ακτινοβολίας.

Από το **Γράφημα 3-1** και το **Γράφημα 3-2** φαίνεται πως παρουσία και μη του αναστολέα μέχρι τις 2h παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά.

Για 1 Gy, απουσία αναστολέα, σύμφωνα και με την προηγούμενη μελέτη, ο αριθμός των πρωτεϊνών 53BP1 είναι πάντα σημαντικά μεγαλύτερος των πρωτεϊνών γH2AX. Έτσι, σύμφωνα με τον ορισμό του Pdc είναι αναμενόμενο, να συνεντοπίζεται περισσότερο η γH2AX στην 53BP1 και επομένως οι τιμές της απόκλισης να είναι πολύ υψηλές. Ορθά, παρατηρούμε ότι για 2 Gy στην 1h, ο αριθμός των 53BP1 είναι μικρότερος από των γH2AX και ο συνεντοπισμός έχει μικρότερη ποσοστιαία απόκλιση. Παρόμοια συμπεριφορά, παρατηρούμε για τον συνεντοπισμό, παρουσία αναστολέα, όπου και πάλι μόνο στην περίπτωση των 2 Gy ο αριθμός των πρωτεϊνών 53BP1 είναι μικρότερος των πρωτεϊνών γH2AX και η ποσοστιαία απόκλιση είναι η μικρότερη. **Γράφημα 3-1** και **Γράφημα 3-2**

Από όλα τα παραπάνω, παρατηρήσαμε και τη συσχέτιση των εστιών 53BP1 συγκριτικά με το πλήθος των εστιών γH2AX και το συνεντοπισμό τους. Είδαμε λοιπόν, ότι με την αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας, παρουσία και μη αναστολέα, ο συνεντοπισμός τους μειώνεται. Αυτό σημαίνει, ότι με την αύξηση της ακτινοβολίας, το ποσοστό των δίκλωνων θραύσεων στις οποίες συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη 53BP1, μειώνεται.

Η συμπεριφορά αυτή δείχνει ότι με την αύξηση της δόσης και την πάροδο του χρόνου οι εστίες κατανέμονται διαφορετικά, δηλαδή αλλάζει η επιφάνεια που κάλυπταν. Σύμφωνα με Asako J. Nakamura et al. [2] ο αριθμός των εστιών γH2AX μειώνεται μετά από το χρονικό διάστημα 30'-1h, αλλά ένα σημαντικό κλάσμα παραμένει για μερικές ώρες ή ακόμη και ημέρες μετά την έκθεση. Οι εστίες γH2AX εξαφανίζονται με σχετικά ταχύ ρυθμό για τις πρώτες λίγες ώρες μετά την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, με χρόνο ημιζωής περίπου 2 ώρες, αλλά μετά από αυτό, ο ρυθμός εξαφάνισης της εστίας επιβραδύνεται σε μεγάλο βαθμό, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι δέκα φορές πιο αργός. Επιπλέον, σύμφωνα με την έρευνα, E.Markova et al.[3], ο συνεντοπισμός των γH2AX και των εστιών 53BP1 εξαρτάται από το χρόνο δόσης και μετά την ακτινοβολία. Μερικές εστίες που παράγονται από την γH2AX και την πρωτεΐνη 53BP1 που συνεντοπίζονται με τις δίκλωνες θραύσεις DNA που προκαλούνται, από την ακτινοβολία, παραμένουν στα κύτταρα σχετικά πολύ καιρό μετά την ακτινοβολία και

δείχνουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ κυτταρικής ακτινοευαισθησίας και υπολειμμάτων εστιών.

Τα πολύ μεγάλα σφάλματα  $std_{dev}$  στα 0 Gy ερμηνεύονται από το γεγονός ότι ο αριθμός των εστιών ανά κύτταρο και για τις δύο πρωτεΐνες είναι μικρός. Τα μηδενικά στοιχεία παρέχουν επίσης πληροφορία για αυτό και δεν απαλείφθηκαν κατά την επεξεργασία των αριθμητικών δεδομένων.

## Βιβλιογραφία

1. Masaaki Yanai, Haruhiko Makino, Bingqiong Ping, Kenichi Takeda, Natsumi Tanaka, Tomohiro Sakamoto, Kosuke Yamaguchi, Masahiro Kodani, Akira Yamasaki, Tadashi Igishi, and Eiji Shimizu, "DNA-PK Inhibition by NU7441 Enhances Chemosensitivity to Topoisomerase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells by BlockinDNA Damage Repair", 2017
2. Asako Nakamura, Olga A Martin, Christophe Redon, William M Bonner, "Techniques for  $\gamma$ H2AX Detection", 2006
3. E. Markova, N. Schultz & I. Y. Belyaev "Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ $\gamma$ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival", 2007

## Παράρτημα 3<sup>ης</sup> μελέτης

Exp01, A549 cells Pcl of 53BP1 over the  $\gamma$ H2AX foci -NU7441

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	25,44	61,65	76,47	46,3	84,46	131,39
1	78,34	52,27	36,48	140,32	70,52	260,77
2		33,98	41,81	70,21		
<b>stdev**</b>						
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	21	33	49	39	84	109
1	52	30	18	82	61	140
2		17	23	47		

Exp01, A549 cells Pcl of 53BP1 over the  $\gamma$ H2AX foci (+NU7441)

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	33,24	23,2	100,57	14,33	122,28	97,03
1	52,54	55,39	54,8	38,52	39,77	59,88
2	56,19	36,02	35,71	35,78	45,8	40,41
<b>stdev*</b>						
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	20	22	84	11	70	74
1	29	31	27	19	21	30
2	50	19	6	18	23	20

Exp01, A549 cells Pcl of  $\gamma$ H2AX over the 53BP1 foci -NU7441

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	130,83	110,03	243,19	251,75		440,02
1	228,66	165,62	100,76	556,49	390,46	
2		60,95	132,34	274,07		
<b>stdev*</b>						
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	114	94	192	261		338
1	191	107	52	328	315	
2		32	80	221		

Exp01, A549 cells Pcl of  $\gamma$ H2AX over the 53BP1 foci (+NU7441)

Δόση	Χρόνος					
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	157,8	135,57		162,98		492,66
1	250,3	144,23	144,6	108,4	126,57	174,25
2	204,47	72,62	79,18	68,14	93,52	91,17
<b>stdev*</b>						
Gy	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0	199	175		233		456
1	153	91	74	56	74	94
2	134	38	43	34	2	48

## Κεφάλαιο 8

### 4<sup>η</sup> μελέτη : Διάκριση υπερχρωματικών και μη περιοχών στο κύτταρο

#### 4.1 Σκοπός

Στο υπολογιστικό κομμάτι που ακολουθεί, διερευνήθηκε η επιδιόρθωση των ΔΚΘ σε συνάρτηση με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της βλάβης, και συγκεκριμένα ως προς την ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη.

#### 4.2 Μεθοδολογία της Ανάλυσης

##### Α' μέρος

Αρχικά, έγινε ο υπολογισμός της παραμέτρου συνεντοπισμού Pclc του DAPI πάνω στις γΗ2ΑΧ εστίες (" Pclc of DAPI over the γΗ2ΑΧ foci") μέσω του λογισμικού IMARIS.

Για να υπολογίσουμε την παράμετρο συνεντοπισμού ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στην 3<sup>η</sup> μελέτη με επιλογή διαφορετικών καρτελών από το Excel. Συγκεκριμένα:

- Ο αριθμητής του κλάσματος της εξίσωσης E.3-1 υπολογίζεται από την καρτέλα με όνομα "Vesicles γΗ2ΑΧ Intensity Mean ch=1".
- Ορίζουμε ως παρανομαστή το κλάσμα  $\frac{A-B}{\Gamma-\Delta}$ :

A = "Cell Cytoplasm Intensity Sum ch=1",

B = "Vesicles γΗ2ΑΧ Intensity Sum ch=1". Για να εκφραστεί το αποτέλεσμα «ανά κύτταρο» ακολουθείται η εξής επεξεργασία:

DATA→Subtotal→At each change in

Use function

Add subtotal to



$\Gamma$ = "Cell Number of Voxels",

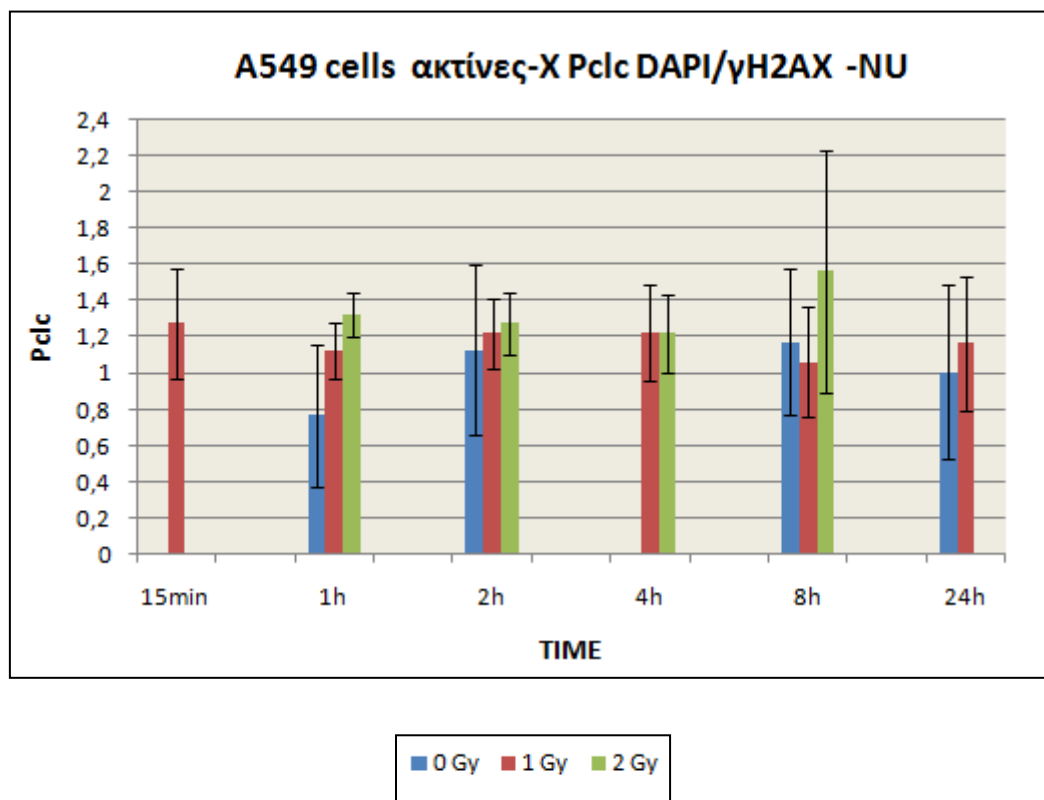
$\Delta$ = "Vesicles  $\gamma$ H2AX Number of Voxels", με την εξής επεξεργασία:

DATA→Subtotal→At each change in

Use function

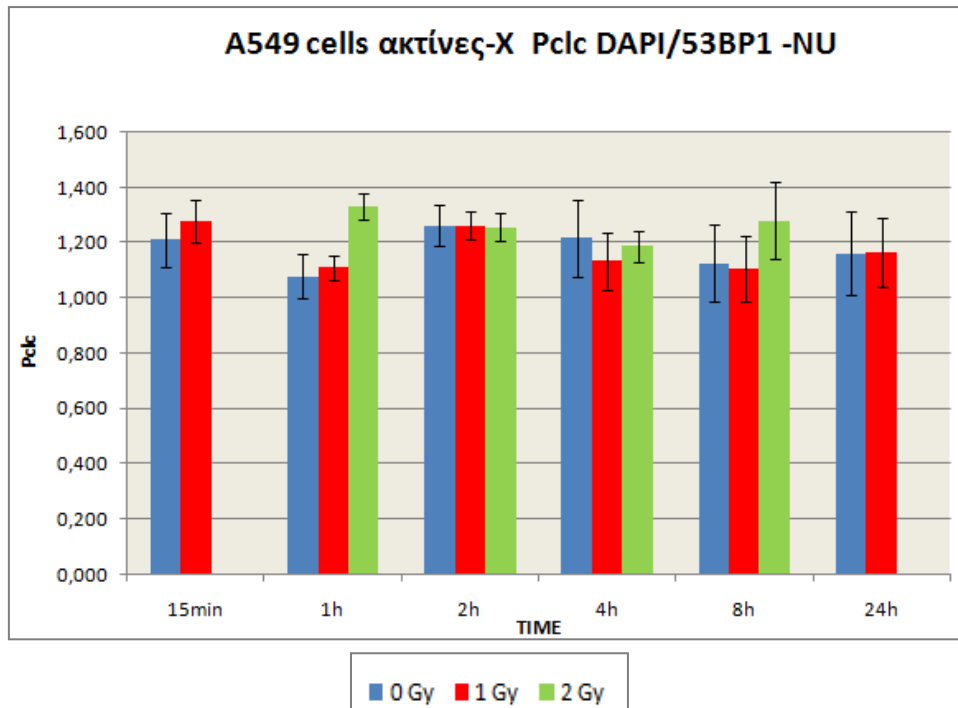
Add subtotal to

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η σχέση του Pclc του DAPI πάνω στις εστίες  $\gamma$ H2AX, συναρτήσει του χρόνου για τις διάφορες δόσεις δίνεται στο **Γράφημα 4-1**.



Γράφημα 4-1: : Μελέτη συνεντοπισμού του DAPI πάνω στις  $\gamma$ H2AXεστίες (" Pclc of DAPI over the  $\gamma$ H2AX foci"), σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες- X χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο Pclc και η ανάλυση έχει γίνει μέσω του λογισμικού IMARIS. Οι πυρηνίσκοι του κυττάρου λαμβάνονται υπόψιν.

Ομοίως, παρουσιάζεται, η σχέση του Pclc του DAPI πάνω στις εστίες 53BP1, συναρτήσει του χρόνου για τις διάφορες δόσεις δίνεται στο **Γράφημα 4-2**.



Γράφημα 4-2: Μελέτη συνεντοπισμού του DAPI πάνω στις 53BP1εστίες (“ Pcl c of DAPI over the 53BP1 foci”), σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες- X χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο Pcl c και η ανάλυση έχει γίνει μέσω του λογισμικού IMARIS. Οι πυρηνίσκοι του κυττάρου λαμβάνονται υπόψιν.

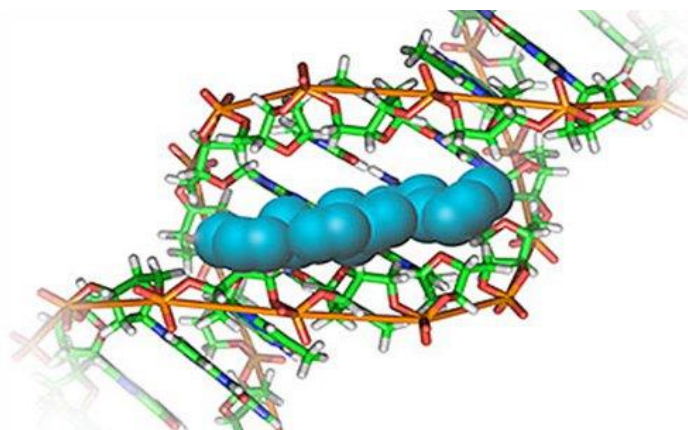
Από το **Γράφημα 4-1** και **Γράφημα 4-2**, φαίνεται πως η τιμή του Pcl c, παρεκκλίνει κατά περιπτώσεις από τη μονάδα και πιθανώς να περιέχει ψευδώς θετικές (>1) τιμές του Pcl c, αφού είναι γνωστό πως τιμές του Pcl c σημαντικά μεγαλύτερες του 1 εκφράζουν αληθή συνεντοπισμό, με ενδεχομένως μία τάση προς την ετεροχρωματίνη. Έχοντας υπόψιν, το **Γράφημα 1-3** από την 1<sup>η</sup> μελέτη, παρατηρείται ότι ο αριθμός των επαγόμενων εστιών γH2AX παρουσιάζει την ίδια γραμμική σχέση με την πάροδο του χρόνου ανά δόση, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην τιμή του Pcl c στο **Γράφημα 4-1** και **Γράφημα 4-2**.

Στην ανάλυση μέσω του IMARIS από τις 3D εικόνες, λαμβάνονται υπόψιν και οι πυρηνίσκοι του κυττάρου. Γι αυτό το λόγο στο δεύτερο μέρος αυτής της μελέτης θα γίνει η ανάλυση με κατάλληλα λογισμικά επεξεργασίας εικόνων με στόχο να παραληφθεί η επιφάνεια των πυρηνίσκων στα κύτταρα από το μέγεθος «υπόλοιπο του πυρήνα», της παραμέτρου Pcl c.

## Β' μέρος

### 4.3 Ανάλυση με στόχο την αποφυγή των πυρηνίσκων

Προκειμένου να βελτιωθεί η προηγούμενη ανάλυση, στοχεύσαμε στην παράλειψη της επιφάνειας των πυρηνίσκων του κυττάρου. Το DAPI ή αλλιώς 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη είναι ο δείκτης ευχρωματίνης/ ετεροχρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε. Είναι μία χρώση που δεσμεύεται ισχυρά σε περιοχές αδενίνης-θυμίνης του DNA και χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού. Όταν συνδέεται με το δίκλωνο DNA, έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 358 nm και το μέγιστο της εκπομπής του είναι στα 461 nm.



Εικόνα Υ4:PureBlu™ DAPI Dye

Για τη μικροσκοπία φθορισμού, το DAPI διεγείρεται με υπεριώδες φως και ανιχνεύεται μέσω ενός φίλτρου κυανού. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψιν τους πυρηνίσκους, είναι πιθανό να οδηγηθούμε σε παρελκυστικά αποτελέσματα. Αυτό συμβαίνει, γιατί το DNA στους πυρηνίσκους είναι μονόκλωνο οπότε το DAPI δε μπορεί να βάψει την περιοχή αυτή. Κατ' επέκταση, δεν έχουμε εμφάνιση δίκλωνων θραύσεων, άρα ούτε και εστιών.

Έτσι, ακολουθήθηκε μια σχετικά χρονοβόρα και λεπτομερής διαδικασία αποφυγής και απόκλισης των πυρηνίσκων στις εικόνες 2D. Λόγω της μέσης έντασης της επιφάνειας, που καλύπτει τον εξεταζόμενο όγκο του κυττάρου που χρησιμοποιείται στο Pclc εξ' ορισμού, οι περιοχές που καταλαμβάνουν οι πυρηνίσκοι αφαιρέθηκαν. Με τον τρόπο αυτό στοχεύσαμε στο να μειωθεί το σφάλμα στις επόμενες μετρήσεις για τον υπολογισμό του Pclc. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια της διαδικασίας, κάθε διαθέσιμη εικόνα μικροσκοπίου, χρειάστηκε να «κοπεί» σε επιμέρους εικόνες (κατά μέσο όρο σε τέσσερις). Η κατάτμηση των εικόνων βοήθησε στον καλύτερο ορισμό των προς αποφυγήν περιοχών κατά το στάδιο του ορισμού των «αντικειμένων», δηλαδή των πυρήνων των κυττάρων.

Προκειμένου να ξεκινήσει η ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα λογισμικά επεξεργασίας εικόνων, το ImageJ, το JCountPro και το JQuantPlus, έτσι ώστε στη συνέχεια να υπολογισθεί το Pclx για τις διάφορες δόσεις και χρονικές στιγμές.

Τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν και περάστηκαν στο MSExcel και η επεξεργασία τους έγινε πλέον μέσω του MSExcel και του OriginPro9. Με τη βοήθεια του Origin κατασκευάστηκαν τα ιστογράμματα, αφού πρώτα δημιουργήθηκαν στο Excel οι κατάλληλες κλάσεις με τις αντίστοιχες συχνότητες. Τα ιστογράμματα παρατίθενται στο παράρτημα, στο τέλος της 4<sup>ης</sup> μελέτης.

## 4.4 Η ανάλυση με τα λογισμικά

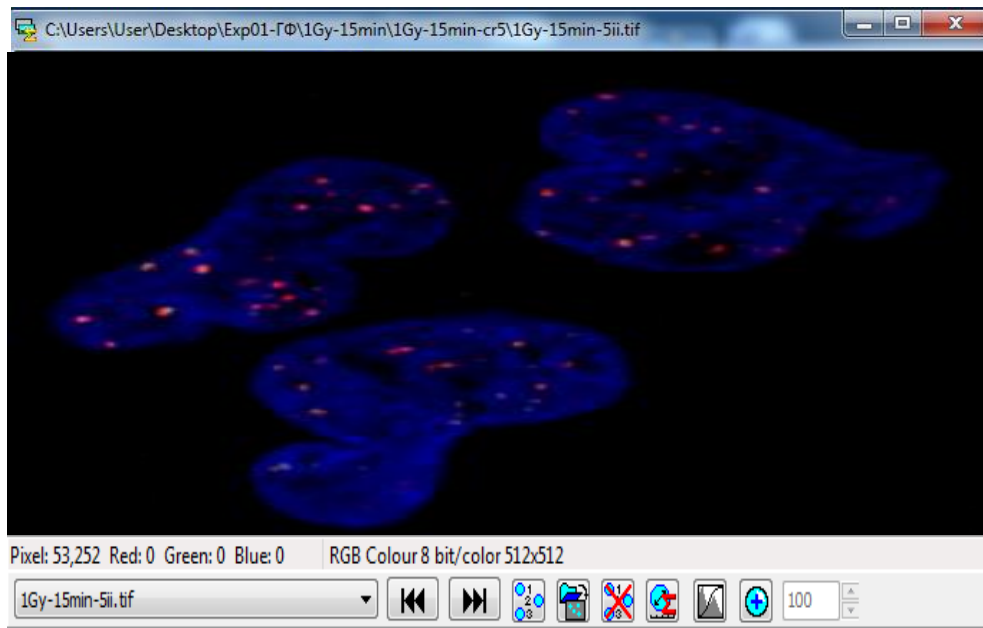
Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το ImageJ για την μετατροπή των εικόνων, 3D τύπου .lif, που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο, σε 2D τύπου .tif, όπως παρουσιάστηκε στην 2<sup>η</sup> μελέτη.

Μετά την μετατροπή των εικόνων σε τύπου .tif, σειρά έχει η ανάλυση με τα λογισμικά JCountPro και JQuantPlus. Μολονότι έχει παρουσιαστεί εκτενώς η μεθοδολογία και η χρήση των λογισμικών αυτών, εδώ θα παρουσιαστούν στιγμιότυπα εικόνων προκειμένου να γίνει αντιληπτή η διαφορά των εικόνων με την απουσία πυρηνίσκων.

### 4.4.1 Η χρήση του λογισμικού JCountPro

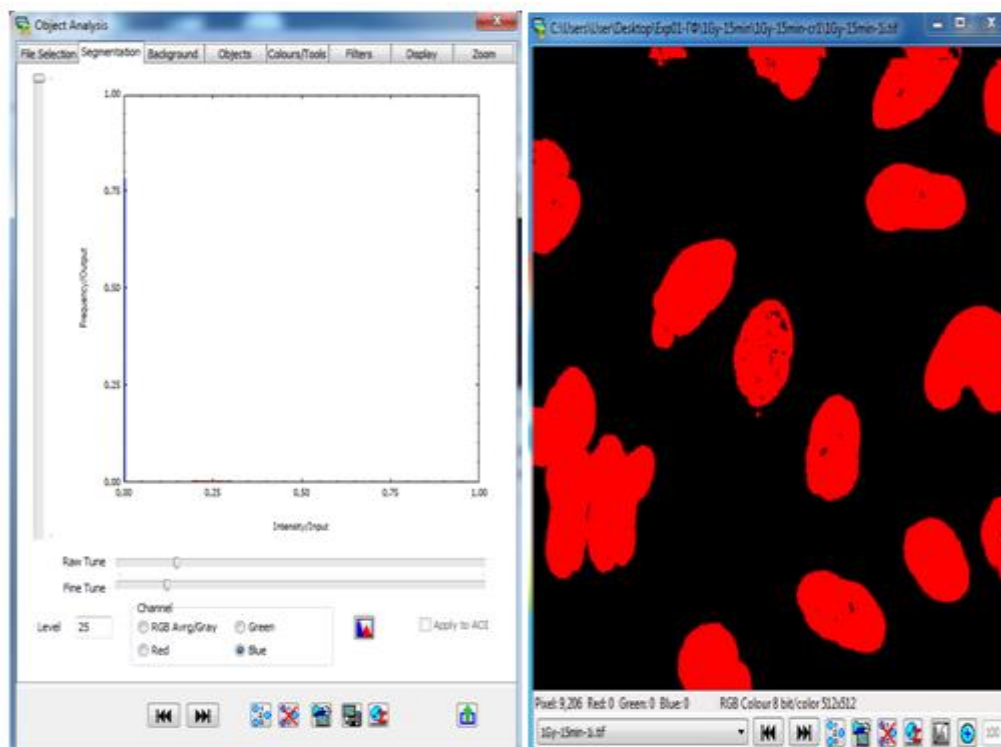
Με τη χρήση του λογισμικού επεξεργασίας εικόνων JCount συνεχίζεται η ανάλυση. Επιλέγουμε το *Object Analysis* για την αναγνώριση και την ανάλυση των μεγάλων αντικειμένων μίας εικόνας. Στην *File Selection* (Επιλογή Αρχείων) αναζητούμε το φάκελο με τις εικόνες τύπου .tif που έχουν δημιουργηθεί μέσω του ImageJ και που θα αναλύσει το πρόγραμμα και στη συνέχεια πατάμε Display.

Παρακάτω δίνεται ένα σχετικό στιγμιότυπο, **Εικόνα 4-1**.



Εικόνα Υ4-1: Στιγμιότυπο μίας εικόνας τύπου .tif, η οποία εμφανίζεται έπειτα από την εντολή "Display" (Εκθεση)


- Επιλέγουμε το *Segmentation* (Διαχωρισμός) και κάνουμε κλικ στο Channel Blue έτσι ώστε να οριστεί το χρώμα, σύμφωνα με το οποίο θα γίνει η επιλογή των αντικειμένων. Παρακάτω δίνεται ένα στιγμιότυπο, **Εικόνα Υ4-2**.



Εικόνα Υ4-2: Στιγμιότυπο της καρτέλας *Segmentation* (Διαχωρισμός)

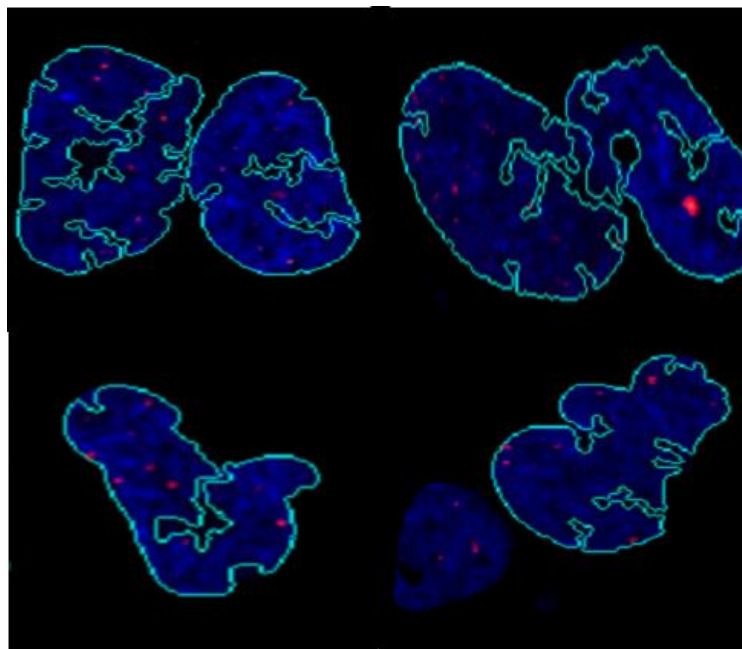
- Επιλέγουμε το *Objects* (Αντικείμενα) και απεπιλέγουμε στον τομέα *Holes* το κουτάκι "Auto Fill Small Holes" (Αυτόματη Κάλυψη Μικρών Οπών) καθώς δεν

επιθυμούμε οι σπές να γεμίζουν και να λαμβάνονται υπόψη ως μέρος του αντικειμένου. Στις συμβατικές αναλύσεις χρησιμοποιούμε την επιλογή “Auto Fill Small Holes”, ή όταν μας ενδιαφέρει να μετρήσουμε την επιφάνεια του κυττάρου. Το γεγονός ότι δεν το επιλέγουμε σε αυτού του είδους την ανάλυση μας επιτρέπει την εξαίρεση των πυρηνίσκων.

- Έπειτα κλικάρουμε το κάτω αριστερά εικονίδιο “IdentifyObjectsforcurrentImage”, , για την ανίχνευση των μεγάλων αντικειμένων στην εικόνα βασιζόμενη στις παραμέτρους διαχωρισμού που έχουμε θέσει. Δίνεται ένα στιγμιότυπο, **Εικόνα Υ4-3**.
- Με δεξί κλικ πάνω στην εικόνα εμφανίζονται διάφορα εργαλεία “Object Splitting Tools”( Εργαλεία Χωρισμού Αντικειμένων) έτσι ώστε να επιτρέπεται χειροκίνητα περαιτέρω επεξεργασία.

Κύτταρα τα οποία είναι μισά ή δεν έχουν εστίες, τα διαγράφουμε ( “Click Delete”). Για να διαχωρίσουμε αντικείμενα τα οποία αλληλοεπικαλύπτονται επιλέγουμε “One-Point Split”(εντός του αντικειμένου, διαιρείται αυτόματα σε δύο αντικείμενα διατηρώντας το σημείο πάνω στην τομή τους) ή “ Two Point-Split” (διατηρώντας τα δύο σημεία πάνω στην τομή τους) αναλόγως.

Με την επιλογή “Free Hand Split” (Ελεύθερη Διαίρεση) με τομή που σχεδιάστηκε χειροκίνητα επιλέχθηκαν τα μαύρα σημεία τα οποία πιθανόν να αντικατόπτριζαν πυρηνίσκους.

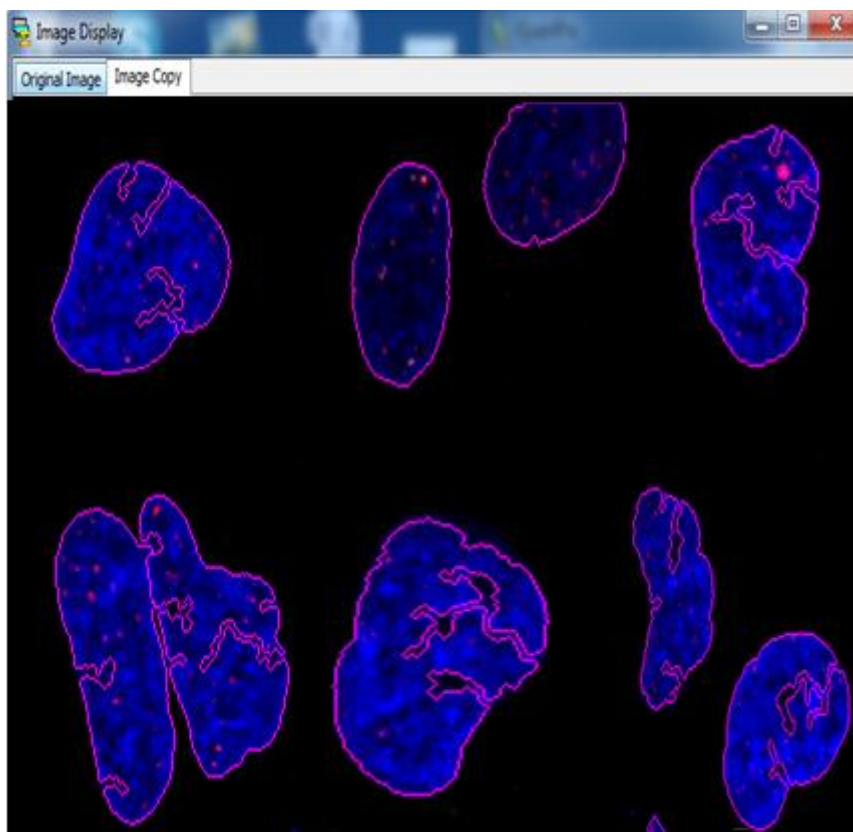


Εικόνα Υ4-3: Στιγμιότυπο των ανιχνεύσιμων αντικειμένων, με το χαρακτηριστικό περίγραμμα γύρω από την περιοχή

### 3.4.2 Η χρήση του λογισμικού JQuantPlus

Με τη χρήση του λογισμικού JQuantPlus ως μεταγενέστερης έκδοσης του JCountPro, το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των εστιών, συνεχίζεται η ανάλυση.

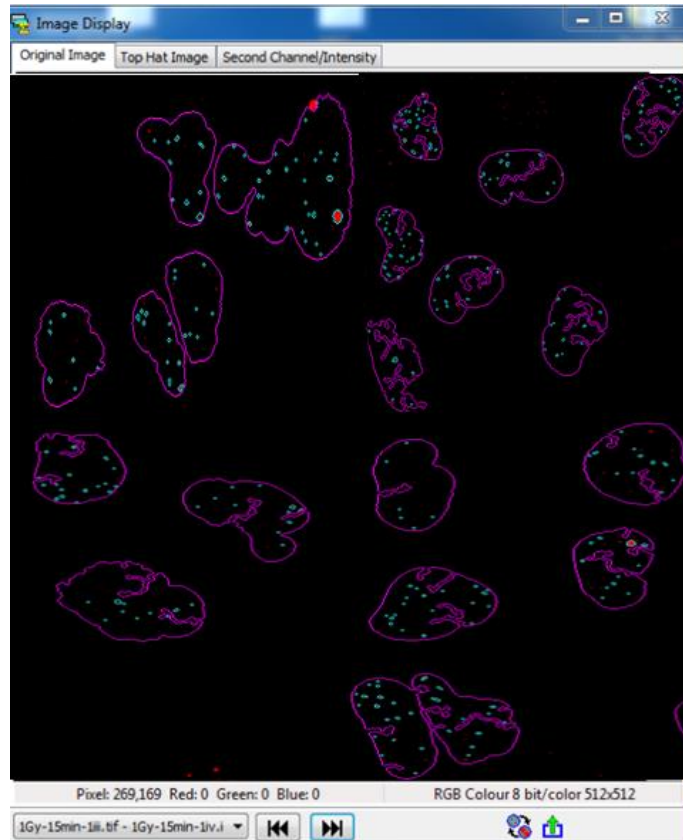
- Στην καρτέλα “ Foci Counting” επιλέγουμε το “Images” και επιλέγουμε όλες τις εικόνες που θέλουμε να δουλέψουμε τύπου .tif και τις προσθέτουμε στο αριστερό παράθυρο “Image Files” (Αρχείο Εικόνων). Στη συνέχεια, στο πλαίσιο “View Files” επιλέγουμε το “ObjectCollections” και τα προσθέτουμε στο αριστερό παράθυρο “Object Collection Files” (Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων) τα αντίστοιχα αρχεία τύπου .ios και επιλέγοντας το κουτί “Select” (Επιλογή), ανοίγει η περιήγηση εικόνων για να ξεκινήσει η ανάλυση των εστιών στις επόμενες καρτέλες. Δίνεται ένα στιγμιότυπο, **Εικόνα Υ4-4**



Εικόνα Υ4-4: Ενδεικτικό στιγμιότυπο μετά την επιλογή των εικόνων για περιήγηση.

- Στη συνέχεια, επιλέγουμε την καρτέλα “Foci Counting” (Μέτρηση Εστιών) και ορίζουμε τις παραμέτρους.

Παρατίθεται ενδεικτικά ένα στιγμιότυπο της ανάλυσης, **εικόνα Υ4-5**, εφόσον έχουν οριστεί όλες οι προαπαιτούμενες παράμετροι.



Εικόνα Υ4-5: Στιγμιότυπο της οθόνης, έπειτα από τον ορισμό των παραμέτρων και την τελική οδό για τη μέτρηση του *Pclc*.

#### 4.5 Υπολογιστικά Αποτελέσματα

Μετά τον ορισμό των βέλτιστων παραμέτρων και την εκκίνηση του JQuantPlus η ανάλυση ολοκληρώνεται και τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε έναν πίνακα με εφτά καρτέλες. Οι καρτέλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα ανάλυση είναι τα: Foci Analysis (Ανάλυση Εστιών), Cell Summary (Σύνοψη Κυττάρου) και Focus Summary (Σύνοψη Focus).

Στην καρτέλα Analysis Summary, η οποία αποτελείται από:

- i. Image File (Όνομα αρχείου)
- ii. Parameters (Παράμετροι) → επίπεδο διαχωρισμού, υπόβαθρο, ελάχιστο μέγεθος
- iii. N of Cells (Αριθμός κυττάρων)
- iv. Average Cell Area (Μέση επιφάνεια του κυττάρου)
- v. Min Foci N (Ελάχιστος αριθμός εστιών ανά κύτταρο)
- vi. Max Foci N (Μέγιστος αριθμός εστιών ανά κύτταρο)



- vii. AvgFociN/ StDevFociN (Μέση τιμή αριθμού εστιών ανά κύτταρο και η τυπική απόκλιση του)
- viii. Focus Area/ StDevFocusArea (Μέση επιφάνεια εστιών και η τυπική απόκλιση του)
- ix. Density/ StDev Density ( Πυκνότητα και η τυπική της απόκλιση)
- x. Ext Norm Co (Δείκτης εξωτερικής κανονικοποίησης)
- xi. Group ID (Ταυτότητα ομάδας )
- xii. Cell Int2/StDev CellInt2 (Ένταση κυττάρου στο κανάλι 2 και η τυπική της απόκλιση)
- xiii. Focus Int 2/ StDev Int 2 (Ένταση των εστιών στο κανάλι 2 και η τυπική της απόκλιση)
- xiv. Pclc/StDev Pclc (Το Pclc και η τυπική απόκλιση του) υπολογίζεται αυτόματα το Pclc καθώς και η τυπική του απόκλιση (StDevPclc).

Στην καρτέλα Cell Summary, η οποία αποτελείται από:

- i. Cell ID (Ταυτότητα Κυττάρου)
- ii. NF (Αριθμός Εστιών)
- iii. Area (Επιφάνεια Κυττάρου)
- iv. No Foci Area ( Επιφάνεια Κυττάρου χωρίς Εστίες)
- v. Intensity ( Ένταση Κυττάρου)
- vi. No Foci Int ( Ένταση περιοχών χωρίς Εστίες)

Μέσω του Excel υπολογίζουμε το Pclc, το οποίο ορίζεται ως  $Pclc = \frac{Intensity}{NoFociInt}$  και στη συνέχεια με τη συνάρτηση Average (μέσος όρος) βρίσκουμε την τελική τιμή για τη συγκεκριμένη δόση και χρόνο.

Για την περαιτέρω ανάλυση και για μεγαλύτερη ακρίβεια στα τελικά αποτελέσματα, χρησιμοποιήσαμε και την τρίτη καρτέλα Focus Summary, η οποία αποτελείται από:

- i. Το Focus Summary ( Ταυτότητα Εστίας)
- ii. Area (Περιοχή Εστίας)
- iii. I (ch1) (Ένταση του πρωτεύοντος καναλιού εντός της εστίας).
- iv. I (ch2) (Ένταση του δευτερεύοντος καναλιού εντός της εστίας).
- v. Pclc

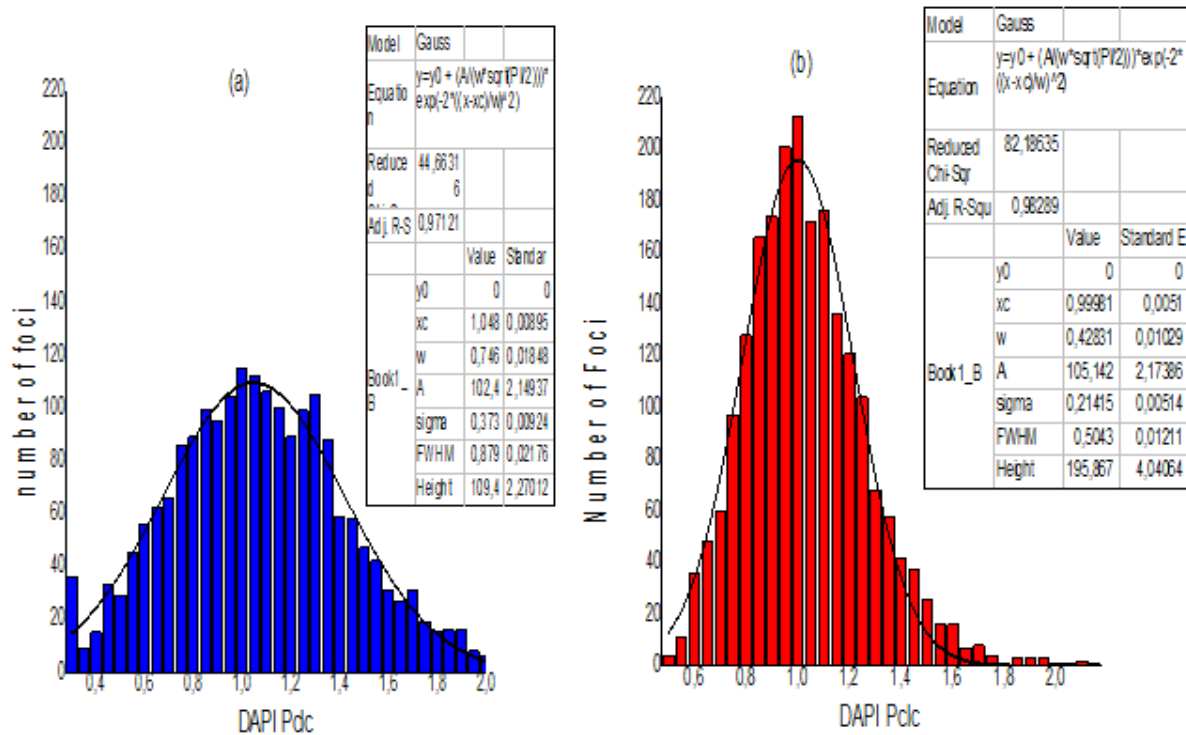
Τα αριθμητικά δεδομένα μέσω του Focus Summary συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

0Gy	TIME	Pclc_FS*	StDev	Pclc_FS-FIT**	StErr	StDev'
	15min	0,983	0,232	0,995	0,007	0,201
	1h	1,011	0,226	0,992	0,009	0,2
	2h	0,956	0,217	0,959	0,007	0,205
	4h	0,974	0,240	0,999	0,005	0,204
	8h	1,009	0,324	0,966	0,014	0,248
	24h	0,975	0,187	0,988	0,008	0,176
<b>1Gy</b>						
	15min	1,049	0,307	1,023	0,01	0,262
	1h	1,075	0,359	1,069	0,005	0,315
	2h	1,007	0,242	1	0,005	0,214
	4h	1,004	0,267	1,011	0,006	0,24
	8h	1,031	0,289	1,03	0,014	0,239
	24h	1,054	0,262	1,059	0,023	0,276
<b>2Gy</b>						
	15min	1,023	0,256	1,011	0,007	0,23
	1h	1,043	0,230	1,043	0,008	0,231
	2h	1,025	0,239	1,024	0,005	0,223
	4h	1,037	0,484	1,007	0,004	0,244
	8h	1,016	0,225	1,024	0,009	0,23
	24h	1,017	0,655	0,979	0,003	0,229
<b>4Gy</b>						
	15min					
	1h	1,074	0,338	1,048	0,004	0,267
	2h	X	X	X	X	X
	4h	X	X	X	X	X
	8h	X	X	X	X	X
	24h	0,986	0,274	0,981	0,007	0,255

Πίνακας Υ4-1: Παρουσίαση των αριθμητικών δεδομένων μέσω της καρτέλας FocusSummary από το λογισμικό JQuantPro. Η στήλη Pclc\_FS είναι υπολογισμένο από το FocusSummary και η στήλη Pclc\_FS-FIT είναι υπολογισμένο μέσω κανονικοποίησης Gauss. Η προσαρμογή της κατανομής Gauss γίνεται με το OriginPro9.

Μέσω του Πίνακα Υ4-1, θα δημιουργηθούν ανά περίπτωση, τα αντίστοιχα ιστογράμματα.

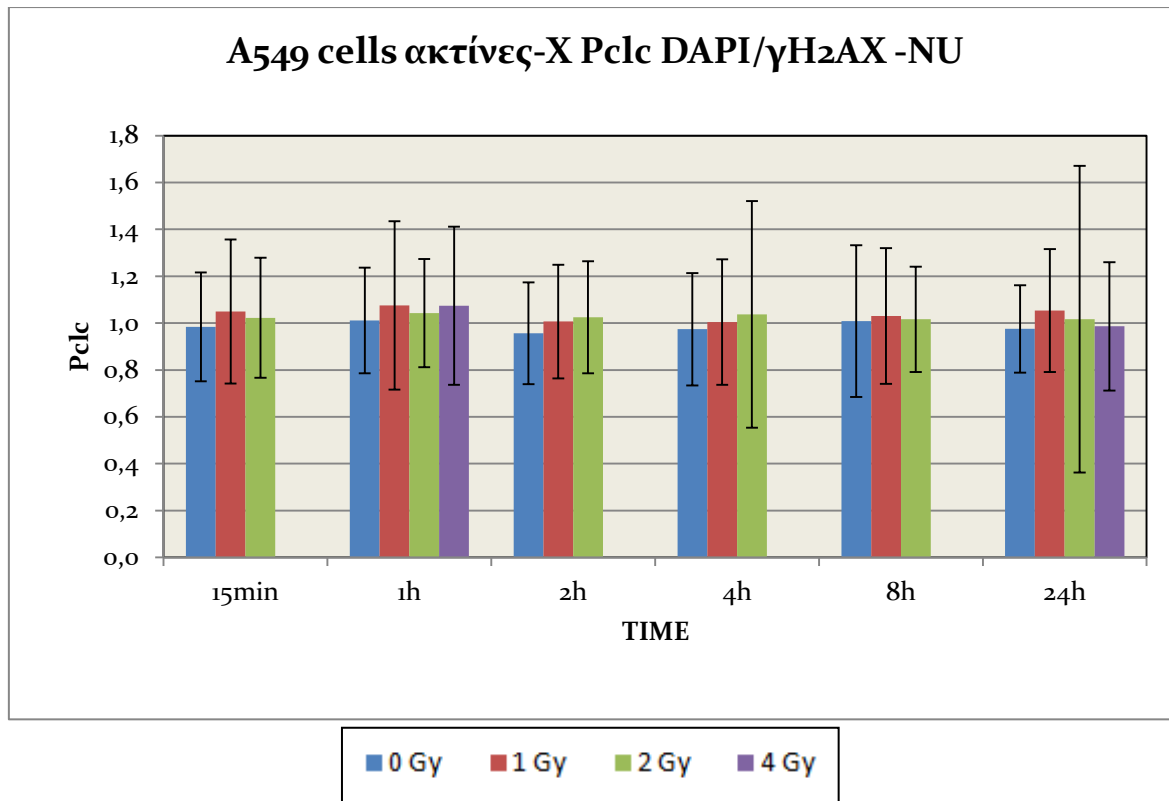
Τα ιστογράμματα για την ανάλυση των δεδομένων με την τυπική απόκλισή τους και με την προσέγγιση με την κατανομή Gauss παρουσιάζονται ενδεικτικά για 1 Gy-1h. Να σημειωθεί ότι για αυτήν την χρονική στιγμή γίνεται και η αντίστοιχη ανάλυση μέσω του IMARIS, με σκοπό τη σύγκριση. Τα ιστογράμματα παρατίθενται ως έχουν.



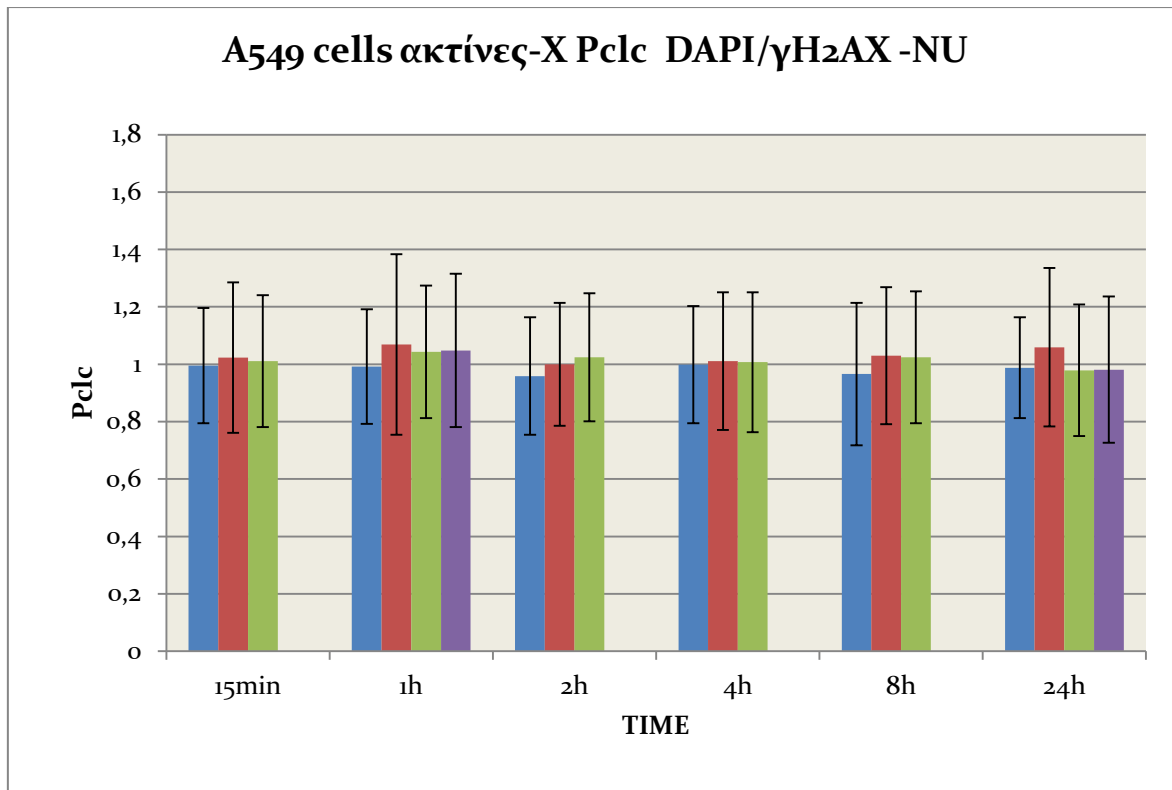
Ιστογράμμα 4-1: Στο πλαίσιο (a) παρουσιάζεται το ιστόγραμμα το οποίο αναλύθηκε μέσω του IMARIS με προσέγγιση κατανομής Gauss. Στο πλαίσιο (b) παρουσιάζεται το ιστόγραμμα το οποίο αναλύθηκε μέσω του JQuantPlus με προσέγγιση κατανομής Gauss. Και τα (a),(b), αναφέρονται για δόση 1 Gy-1h.

Στα δύο παραπάνω ιστογράμματα, **Ιστογράμμα 4-1 (a,b)**, όπως και για όλες τις υπόλοιπες δόσεις και χρόνους, που παρατίθενται στο παράρτημα, δεν παρατηρούνται δύο κορυφές. Ιστογράμματα με δύο κορυφές, δηλαδή διασπορά τιμών περί μίας κλάσης, θα έδειχναν πιθανόν δύο πληθυσμούς εστιών. Αυτό ενδεχομένως να φανέρωνε διαφορετικό πληθυσμό στην ετεροχρωματίνη και την ευχρωματίνη αντίστοιχα.

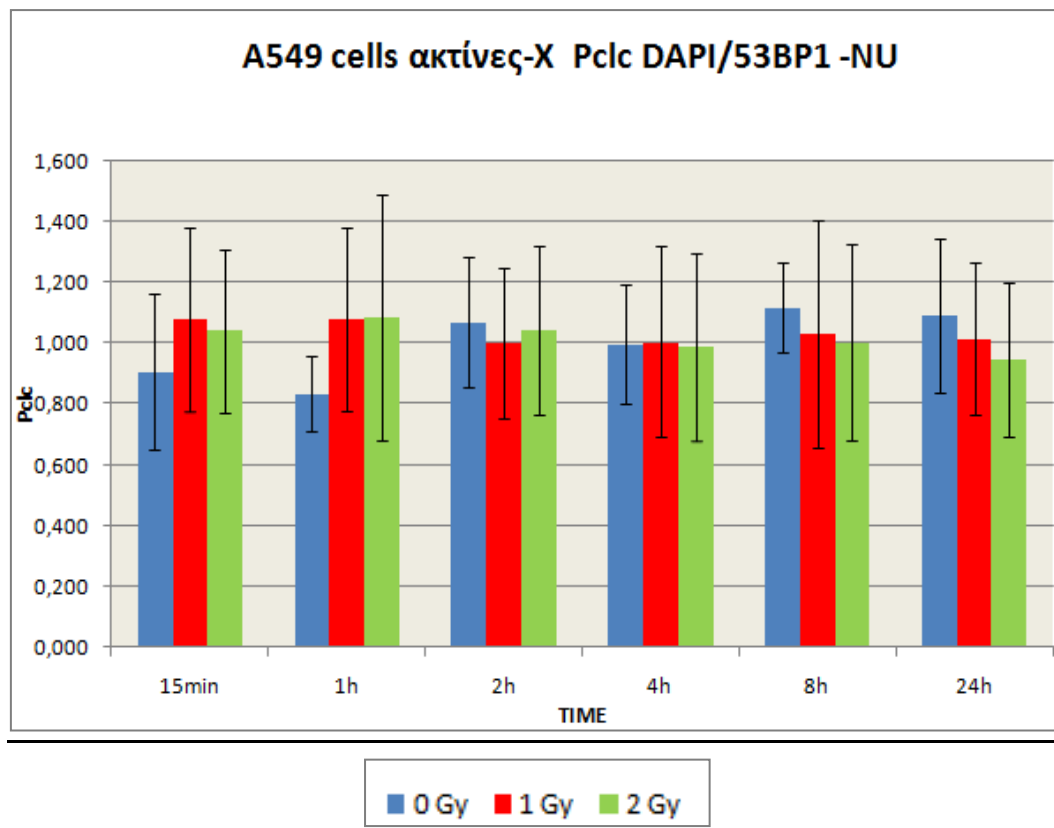
Μέσω των αριθμητικών δεδομένων του Πίνακα Υ4-1, δημιουργήθηκαν τα γραφήματα Pdc του DAPI πάνω στις εστίες γΗ2ΑΧ και Pdc του DAPI πάνω στις εστίες 53BP1 συναρτήσει του χρόνου για τις διάφορες δόσεις.



Γράφημα 4-3: Μελέτη συνεντοπισμού του DAPI πάνω στις γH2AX εστίες (“ Pclc of DAPI over the γH2AX foci”), σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες- X χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο Pclc και η ανάλυση έχει γίνει με τις τιμές από το Focus Summary με τη βοήθεια του λογισμικού JQuantPlus. Η επιφάνεια των πυρηνίσκων στο κύτταρο, έχει παραληφθεί.



Γράφημα 4-4: Μελέτη συνεντοπισμού του DAPI πάνω στις γH2AX εστίες (“ Pcl<sub>c</sub> of DAPI over the γH2AX foci”), σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες-X χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο Pcl<sub>c</sub> και η ανάλυση έχει γίνει με τις τιμές από το OriginPro9 μετά από προσέγγιση με την κατανομή Gauss και με τυπική απόκλιση StDev. Η επιφάνεια των πυρηνίσκων στο κύτταρο, έχει παραληφθεί.



Γράφημα 4-5: Μελέτη συνεντοπισμού του DAPI πάνω στις 53BP1 εστίες (“ Pclc of DAPI over the 53BP1 foci”), σε καρκινικά κύτταρα A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες- X χωρίς αναστολέα επιδιόρθωσης NU 7441. Ο συνεντοπισμός εξετάζεται με την παράμετρο Pclc και η ανάλυση έχει γίνει με τις τιμές από το Focus Summary με τη βοήθεια του λογισμικού JQuantPlus. Η επιφάνεια των πυρηνίσκων στο κύτταρο, έχει παραληφθεί.

## 4.6 Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα

Παρατηρείται, όπως προκύπτει από τα **Γράφημα 4-3**, **Γράφημα 4-4** και **Γράφημα 4-5**, ότι το Pclc κυμαίνεται γύρω από την τιμή 1. Η πληροφορία που δίνει είναι, ότι δεν ξεχωρίζει κάποια ποσοτική διαφορά στο DAPI εντός και εκτός εστιών. Επομένως, η μέθοδος που ακολουθήθηκε αποφαίνεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει προτίμηση στο σχηματισμό εστιών γH2AX μεταξύ ετεροχρωματινής και ετεροχρωματινής, γεγονός που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της Marilen Demond, όπως εξηγείται στη συνέχεια.

Αυτό όμως που ισχύει συμπερασματικά, είναι πως ορθά ακολουθήθηκε η διαδικασία αφαίρεσης των πυρηνίσκων στο Β' μέρος της 4<sup>ης</sup> μελέτης. Παρατηρώντας τα γραφήματα,

**Γράφημα 4-1, Γράφημα 4-2, Γράφημα 4-3 και Γράφημα 4-5,** φαίνεται πως οι τιμές τόσο του PclcdAPI/γH2AX –NU όσο και του PclcdAPI/53BP1 –NU, μολονότι κυμαίνονται γύρω από τη μονάδα η διαφορά τους είναι σημαντική, λαμβάνοντας υπόψιν την τάξη στην οποία ανήκουν. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα η ποσοστιαία απόκλιση των τιμών, του PclcdAPI/γH2AX υπολογισμένο με το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων JQuantPlus, με το PclcdAPI/γH2AX υπολογισμένο με το λογισμικό IMARIS. Στην πρώτη περίπτωση η επιφάνεια των πυρηνίσκων στο κύτταρο έχει παραληφθεί, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η ανάλυση είναι παρουσία πυρηνίσκων.

Δόση/Χρόνος	15min	1h	2h	4h	8h	24h
0 Gy		31,63%	15,36%		13,95%	3,21%
1 Gy	17,77%	4,40%	17,45%	18,01%	2,84%	9,71%
2 Gy		20,90%	19,62%	14,91%	35,01%	

*Πίνακας Υ4-2: Παρουσίαση ποσοστιαίας απόκλισης των μεθόδων ανάλυσης μέσω του IMARIS και του JQuantPlus. Η απόκλιση έχει υπολογιστεί σύμφωνα με τον γενικό τύπο  $\frac{A-B}{A} * 100$*

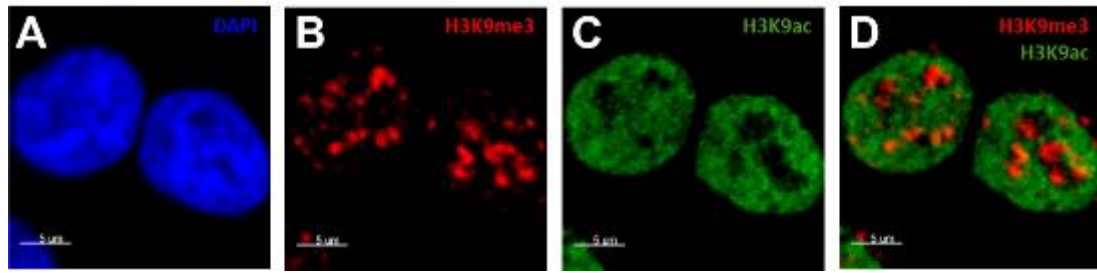
Σε αυτό το σημείο, είναι άξιο να προσθέσουμε ένα παράθεμα από τη διδακτορική διατριβή της Marilen Demond, του Πανεπιστημίου Duisburg-Essen, με θέμα “ The influence of chromatin structure on DNA double strand break repair pathway choice”.

Τμήμα αυτής της διατριβής, ασχολείται με τη μελέτη που κάναμε και εμείς ακριβώς πιο πάνω, με ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνωμα του πνεύμονα - A549-, εκτεθειμένα σε ακτίνες –Χ, δηλαδή πάνω στην ίδια καρκινική σειρά. Να σημειωθεί εδώ ότι και τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση στην παρούσα εργασία προέρχονται από πειράματα που είχαν εκτελεστεί στο ίδιο εργαστήριο στο Έσσεν στα πλαίσια συνεργασίας με το δικό μας εργαστήριο.

Προκειμένου να εξεταστεί η παρουσία φθορίζουσων εστιών σε ετεροχρωματικές και ευχρωματικές περιοχές, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί δείκτες χρωματίνης. Ο ένας είναι ο H3K9me3, ο οποίος αναγνωρίζει ετεροχρωματική πυρηνική περιοχή και σχετίζεται με τη μεταγραφική καταστολή και τη γονιδιωματική σταθερότητα και ο H3K9ac, ο οποίος αναγνωρίζει ευχρωματική πυρηνική περιοχή.

Για τη διάκριση ετεροχρωματικών περιοχών σε ανθρώπινα κύτταρα A549, εφαρμόστηκε το αντίσωμα H3K9me3. Η H3K9me3 χρωματίζει αρκετές ακανόνιστες περιοχές σε όλο τον πυρήνα και σε μικρότερες περιοχές δίπλα στην πυρηνική μεμβράνη.

Για τη διάκριση ευχρωματικών περιοχών εφαρμόστηκε αντίσωμα κατά της H3K9ac. Το H3K9ac σχετίζεται με μεταγραφική δραστηριότητα και εμφανίζεται σε περιοχές υποκινητή<sup>17</sup>. Η χρώση των κυττάρων A549 με τον δείκτη ευχρωματίνης H3K9ac δείχνει μια ομοιόμορφη κατανομή του δείκτη ευχρωματίνης H3K9ac στον πυρήνα με κάποιες ακανόνιστες μη χρωματισμένες περιοχές- κενά. Η ταυτόχρονη ανοσοχρώση (immunostaining) H3K9me3 αποκαλύπτει ότι αυτά τα κενά εμφανίζουν μία προδιάθεση για ετεροχρωματική χρώση.



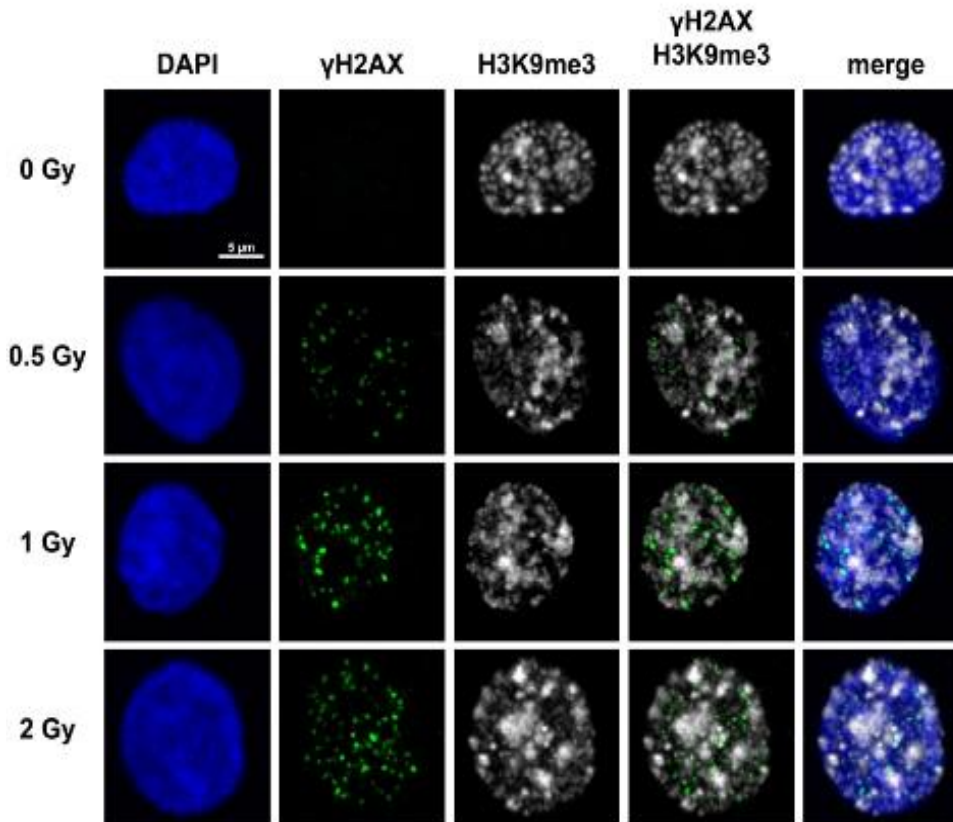
Εικόνα Υ4-6: Χρώση των κυττάρων τύπου A549, με (A) DAPI, (B) με τον δείκτη ετεροχρωματίνης H3K9me3, (C) με τον δείκτη ευχρωματίνης H3K9ac και με (D) ταυτόχρονη ανοσοχρώση με τους δείκτες H3K9me3 και H3K9AC

Στο πείραμα που διεξήχθη, προκειμένου να μελετηθεί η επαγωγή φθορίζουσων εστιών λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας, ακολουθήθηκε αυστηρά το πρωτόκολλο, έτσι ώστε οι συνθήκες να παραμένουν σταθερές κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκαν μεταβολές στη χρώση των δεικτών χρωματίνης, μαρτυρώντας δυναμικές τροποποιήσεις και διαδικασίες αναδιαμόρφωσης, επηρεάζοντας την κυτταρική αρχιτεκτονική της χρωματίνης.

Το σημαντικό όμως εδώ είναι, ότι παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις και στην ποσότητα της ετεροχρωματίνης σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Έτσι, βγήκε το συμπέρασμα ότι για τη μελέτη αυτή η ακτινοβολία δεν έχει κάποια επίδραση στις αλλαγές των ετεροχρωματικών περιοχών. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX στη σερίνη 139, γH2AX, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 5, συμβαίνει μετά τη δημιουργία δίκλωνων θραύσεων. Προκειμένου να εξεταστεί, η επαγωγή και η επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων σε ετεροχρωματικές και ευχρωματικές περιοχές, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης ετεροχρωματίνης H3K9me3 για τον καθορισμό των συμπυκνωμένων περιοχών και η χρώση DAPI για τους πυρήνες των κυττάρων. Τα αποτελέσματα είναι τα εξής:

<sup>17</sup> Οι υποκινητές λειτουργούν σαν γενετικοί διακόπτες. Είναι το μέρος του γονιδίου που ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση, δηλαδή πότε θα αρχίσει και πότε θα σταματήσει η παραγωγή mRNA, το σημείο έναρξης της μεταγραφής καθώς και ποια αλυσίδα DNA θα είναι το καλούπι.





Εικόνα Υ4-7: Ενδεικτικό δείγμα εικόνων κυττάρων μετά από την έλευση 1h από την εκάστοτε δόση ακτινοβολίας (αριστερά) Το DNA είναι χρωματισμένο με DAPI. Εμφανίζονται οι εστίες  $\gamma$ H2AX μόνες του στο πλαίσιο, αλλά και σε συγχώνευση με το δείκτη H3K9me3.

Στα καρκινικά κύτταρα έχουμε εμφάνιση εστιών  $\gamma$ H2AX σε θετικές και αρνητικές περιοχές H3K9me3. Στην παραπάνω παρουσίαση, δίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των κυττάρων μετά από την έλευση μίας ώρας από την ακτινοβολία. Το DNA είναι χρωματισμένο με DAPI έτσι ώστε να οπτικοποιηθούν οι πυρήνες των κυττάρων. Η συγχώνευση έχει γίνει προκειμένου να διακριθούν οι εστίες  $\gamma$ H2AX στις δύο περιοχές. Η πλειοψηφία των εστιών  $\gamma$ H2AX, ανιχνεύτηκαν σε ευχρωματικές περιοχές. Συγκεκριμένα, για παράδειγμα στη 1h μετά την ακτινοβολία με 1 Gy, μετρήθηκαν 50 εστίες ανά πυρήνα. Από αυτές, 40 βρίσκονταν σε ευχρωματική περιοχή και 10 εστίες ανιχνεύτηκαν σε ετεροχρωματική περιοχή.

Συνοπτικά, από όλα τα δεδομένα, κατά μέσο όρο το 83% των εστιών  $\gamma$ H2AX ανιχνεύτηκαν σε ευχρωματικές περιοχές και το 17% συνεντοπίστηκαν σε ετεροχρωματικές περιοχές. Συγκριτικά, το ποσοστό των ετεροχρωματικών περιοχών ήταν 12% και των ευχρωματικών 88%. Καταλήγει άρα στο συμπέρασμα, ότι υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά για τη δημιουργία εστιών  $\gamma$ H2AX σε ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές. Το γεγονός αυτό επομένως, υποδηλώνει παρόμοια επαγωγή

δίκλωνων θραύσεων στις ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές. Ακόμα, η μέγιστη ποσότητα εστιών  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  σε ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές, βρέθηκε μεταξύ 30 λεπτών και 1 ώρας μετά από την ακτινοβολήση, αποκαλύπτοντας ένα παρόμοιο χρονικό πλαίσιο για τη φωσφορυλίωση του  $\text{H}_2\text{AX}$  σε περιοχές συμπυκνωμένης και μη συμπυκνωμένης χρωματίνης.

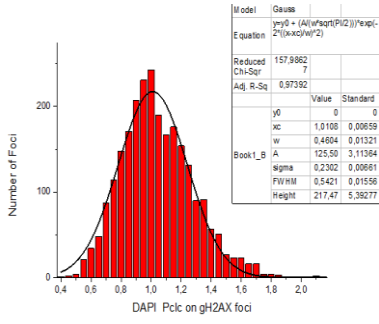
Συμπερασματικά, η μέθοδος ανάλυσης που ακολουθήθηκε και στις δύο περιπτώσεις, αποφαίνεται στο ίδιο αποτέλεσμα. Αυτό σημαίνει, ότι δεν υπάρχει προτίμηση σχηματισμού εστιών στις περιοχές ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης.

Έτσι, η παράμετρος  $\text{Pclc}$  μπορεί αξιόπιστα να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης ετεροχρωματίνης και ευχρωματίνης, για τιμές μεγαλύτερες και μικρότερες της μονάδας αντίστοιχα.

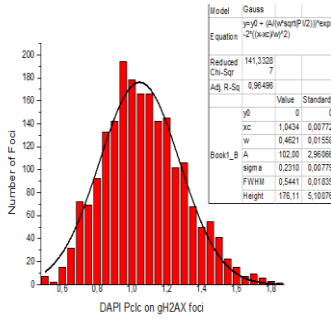
## Βιβλιογραφία

1. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Cooper GM.Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
2. Run-De Jiang, Hong Shen, Ying-Jie Piao, "The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells", 2010.

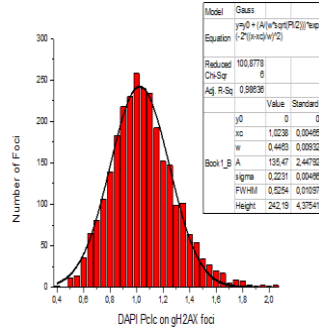




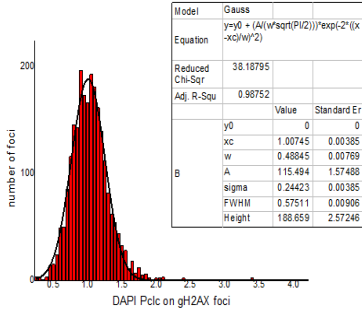
2 Gy- 15min



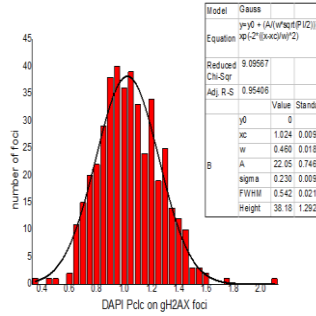
2 Gy- 1h



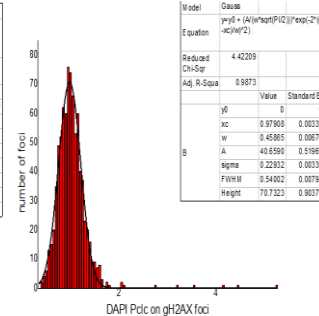
2 Gy- 2h



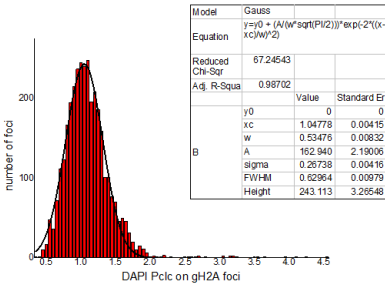
2 Gy- 4h



2 Gy- 8h



2 Gy- 24h



4 Gy - 1h

## Συμπεράσματα

Οι αναλύσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας, βασίστηκαν σε πείραμα με ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνωμα του πνεύμονα τύπου A549, εκτεθειμένα σε ακτίνες  $\gamma$  και με τη μέθοδο του *in situ* ανοσοφθορισμού οπτικοποιήθηκαν οι θέσεις των ΔΚΘ. Αρχικά, στην περίπτωση απουσίας αναστολέα NU7441, παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των επαγόμενων εστιών και των δύο πρωτεϊνών, 53BP1 και  $\gamma$ H2AX, παρουσιάζουν μέγιστο στη 1h και στη συνέχεια μειώνονται ενώ κατά την παρουσία αναστολέα, ο αριθμός των εστιών, τόσο της  $\gamma$ H2AX όσο και της 53BP1, μέχρι και τις 24h παραμένουν σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που μαρτυράει ότι ο αναστολέας δυσχεραίνει την επιδιόρθωση των βλαβών. Ακόμα, παρατηρείται ότι σε αυτές τις δόσεις ο αριθμός των εστιών της  $\gamma$ H2AX είναι μικρότερος από της 53BP1, με εξαίρεση στη 1h και για 2 Gy. Εντούτοις, αυτό που προβλέπεται είναι ότι σε μεγαλύτερες δόσεις, ο αριθμός των εστιών 53BP1 θα είναι μικρότερος των εστιών  $\gamma$ H2AX επαληθεύοντας ότι η 53BP1 υπάρχει ενδογενώς σε αντίθεση με τη  $\gamma$ H2AX που δεν έχει ενδογενή συγκέντρωση και έτσι τα μόρια της 53BP1 δεν επαρκούν να σχηματίσουν εστίες γύρω από κάθε ΔΚΘ. Στη συνέχεια, η σύγκριση των λογισμικών IMARIS και JQuantPlus, για τη μέτρηση των εστιών  $\gamma$ H2AX και 53BP1, αποφαινεται στο συμπέρασμα πως οι τιμές του πλήθους των εστιών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο μεθόδων ανάλυσης, καθώς το IMARIS αφορούσε 3-D εικόνες, ενώ η ανάλυση με τα λογισμικά αφορούσε 2-D εικόνες, με αποτέλεσμα πιθανόν το περιορισμό του όγκου των δεδομένων προς ανάλυση. Μέσω της παραμέτρου Pclc, μελετήθηκε ο συνεντοπισμός μεταξύ των πρωτεϊνών  $\gamma$ H2AX και 53BP1 και παρατηρήθηκε πως τα Pclc σε όλες τις χρονικές στιγμές και δόσεις είναι πολύ μεγαλύτερα του 1 το οποίο δείχνει ότι οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς και οι δύο πρωτεΐνες συμμετέχουν και στους δύο κύριους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των ΔΚΘ και αλληλεπιδρούν φυσικά μετά από ιοντίζουσα ακτινοβολία, υποδηλώνοντας ότι η 53BP1 μετακινείται στις θέσεις των ΔΚΘ του DNA σε απόκριση στην ακτινοβολία- $\gamma$ . Συγκεκριμένα, με την αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας, παρουσία και μη αναστολέα, ο συνεντοπισμός τους μειώνεται, άρα και το ποσοστό των ΔΚΘ στις οποίες συνεντοπίζονται οι δύο πρωτεΐνες, μειώνεται. Επιπλέον, μέσω του λογισμικού IMARIS, έγινε ο υπολογισμός της παραμέτρου συνεντοπισμού Pclc του DAPI πάνω στις  $\gamma$ H2AX εστίες και καθώς το Pclc κυμαίνεται γύρω από την τιμή 1, δείχνει ότι δεν ξεχωρίζει κάποια ποσοτική διαφορά στο DAPI εντός και εκτός εστιών. Τέλος, μετά τη λεπτομερή διαδικασία αποφυγής και απόκλισης των πυρηνίσκων στις εικόνες 2D, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως οι τιμές των Pclc DAPI/ $\gamma$ H2AX, υπολογισμένες με τα λογισμικά JCount και JQuantPro, μολονότι κυμαίνονται γύρω από τη μονάδα η διαφορά τους είναι πράγματι σημαντική και επομένως, αποφανθήκαμε πως υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά για τη δημιουργία εστιών  $\gamma$ H2AX σε ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές, γεγονός που υποδηλώνει παρόμοια επαγωγή ΔΚΘ στις ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές.

# Επίλογος

Οι Δίκλωνες Θραύσεις του DNA, μπορούν να προκύψουν είτε άμεσα μέσω της δράσης εξωγενών παραγόντων, είτε έμμεσα μέσω διαφόρων παραγόντων ειδικά σε κύτταρα που αντιγράφονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ιοντίζουσα ακτινοβολία, η οποία προκαλεί άμεσες και έμμεσες βλάβες. Δικαίως, θεωρούνται πιο σύνθετες και επικίνδυνες βλάβες στο DNA, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια μεγάλου τμήματος του γονιδίου.. Αν οι ΔΚΘ δεν ταυτοποιηθούν και δεν επιδιορθωθούν, ή ακόμα και αν επιδιορθωθούν αλλά λανθασμένα, μπορούν να οδηγήσουν σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, οι οποίες αποτελούν το βασικό παράγοντα μεταλλαξιγένεσης, όπως η καρκινογένεση. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το πυρηνικό DNA διατηρείται είτε ως ευχρωματίνη, είτε ως ετεροχρωματίνη. Η ευχρωματίνη περιέχει την πλειονότητα των μεταγραφόμενων γονιδίων και η διάταξή της στο χώρο είναι χαλαρή, επιτρέποντας την πρόσβαση πρωτεϊνών στο DNA. Τέτοιες πρωτεΐνες μπορεί να είναι είτε επιδιορθώσης είτε μεταγραφικοί παράγοντες, που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου. Αντίθετα, η ετεροχρωματίνη είναι μια πιο συμπυκνωμένη μορφή χρωματίνης όπου παρέχει περιορισμένη πρόσβαση σε παράγοντες μεταγραφής και πρωτεΐνες αποκατάστασης του DNA. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι λόγω της λιγότερο προσιτής φύσης του DNA στην ετεροχρωματίνη, σε σύγκριση με εκείνη στην ευχρωματίνη, η αποκατάσταση των ζημιών στην ετεροχρωματίνη είναι πιο δύσκολη απ' όσο στην ευχρωματίνη. Για το λόγο αυτόν, γίνονται συνεχώς μελέτες, όπως και στην παρούσα διπλωματική εργασία, προκειμένου να εντοπιστεί σε ποια ενδοκυττάρια περιοχή, λαμβάνει χώρα η βλάβη.

Στην έρευνα αυτή βασικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες ελέγχου και επιδιορθώσης των ΔΚΘ, εκ των οποίων δύο πολύ βασικές είναι οι 53BP1 και γH2AX. Η όλο και αυξανόμενη συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών, με την επιλογή των μηχανισμών απόκρισης των ΔΚΘ, αλλά και την περιοχή εμφάνισής τους καθιστά αναγκαία τη συνεχή μελέτη τους. Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Ζαχαρένιας Νικητάκη, προκειμένου να μελετηθούν οι ΔΚΘ και ο συνεντοπισμός μεταξύ των πρωτεϊνών, μέσω της ανάλυσης των εικόνων φθορισμού, ορίστηκε η παράμετρος συνεντοπισμού Pdc, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η παράμετρος αυτή, είναι μία σημαντική πρόοδος, καθώς εξετάζει τη μέση ένταση ενός δεδομένου καναλιού φθορισμού που εξετάζεται στην περιοχή της εστίας ΔΚΘ, προς τη μέση ένταση στον υπόλοιπο πυρήνα. Έτσι μας δίνει στοχευμένες πληροφορίες για την ακριβή θέση που εμφανίζονται οι εστίες φθορισμού για κάθε ένα κύτταρο ξεχωριστά. Ένα ακόμα πλεονέκτημα, είναι πως η παράμετρος Pdc είναι ανεξάρτητη των συνθηκών λήψης των εικόνων. Έτσι διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτόκολλα, μπορούν να την χρησιμοποιήσουν και για μετα-ανάλυση πειραμάτων. Σημαντική εφαρμογή της Pdc είναι πως μπορεί να ανιχνεύσει σύνθετες βλάβες DNA. Για τιμές μικρότερες της μονάδας εκφράζει ανάστροφο συνεντοπισμό, για τιμές περίπου ίσες με τη μονάδα εκφράζει τυχαίο συνεντοπισμό και για τιμές μεγαλύτερες της μονάδας εκφράζει αληθή συνεντοπισμό.

Μία ακόμα σημαντική εφαρμογή της παραμέτρου, εξ' ορισμού, είναι ο εντοπισμός των ΔΚΘ στην περιοχή της ετεροχρωματίνης και ευχρωματίνης. Οι τιμές της  $P_{cl}$  οι οποίες είναι μικρότερες από 1 υποδηλώνουν τον εντοπισμό της εστίας της ΔΚΘ σε περιοχές DNA ευχρωματίνης, όπου η ένταση του DAPI αναμένεται να είναι χαμηλότερη. Η παράμετρος αυτή λοιπόν, είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της τοπολογίας των βλαβών σε ποικίλους τύπους κυττάρων.