

Όνομα υποψήφιου διδάκτορα: Παπαλουκά Χαρίκλεια

Τριμελής επιτροπή: 1) Γοργούλης Βασίλειος (Επιβλέπων), 2) Κοτσίνας Αθανάσιος, 3) Γκάγκος Σαράντης

Τίτλος διατριβής: Βιολογικός ρόλος και αποσαφήνιση μηχανισμών βιογένεσης και επιδιόρθωσης εύθραυστων τελομερών στον άνθρωπο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελομερίδια στα άκρα των χρωμοσωμάτων και οι λεγόμενες κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις αποτελούν φυλογενετικά συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος υπερευαίσθητες στο στρες αντιγραφής του DNA. Οι θέσεις αυτές είναι περισσότερο ευάλωτες σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και έχουν συνδεθεί τόσο με την εμφάνιση της νεοπλασίας όσο και την ανάπτυξη γονιδιωματικής αστάθειας στον καρκίνο η οποία περιπλέκει κάθε γνωστή ογκοθεραπεία. Σε αντιστοιχία με τις κοινές εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος, τα τελομερή καρκινικών κυττάρων και κυττάρων που υφίστανται στρες αντιγραφής, παρουσιάζουν ιδιαίτερο φαινότυπο φθορισμικής μικροσκοπίας μετά από υβριδισμό *in situ*, ο οποίος ονομάστηκε «εύθραυστα τελομερή» (Fragile Telomeres, FTs). Η επαγωγή των FTs, σε συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να επιτευχθεί μέσω αφιδικολίνης, υπερέκφραση του ογκογονιδίου Κυκλίνη Ε ή με τη διαγραφή/αποσιώπηση γονιδίων τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται με τη δομή ή τη λειτουργία των τελομερών. Τα γονίδια αυτά αφορούν κυρίως πρωτεΐνες που βοηθούν την προέλαση της αντιγραφικής μηχανής και την επέκταση της αντιγραφικής διχάλας στα τελομερή. Σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή των τελομερών κατέχουν οι RecQL ελικάσες, καθώς η απουσία της RecQL4 ή της BLM, οδηγεί σε υπερέκφραση του φαινοτύπου των FTs. Τα FTs φαίνεται πως προκύπτουν κατά τη φάση S με ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση μονόπλευρων δίκλωνων θραύσεων μέσω συντηρητικής αντιγραφής του DNA, δια της ενεργοποίησης, νέου, εν πολλοίς άγνωστου μονοπατιού επικουρικού μηχανισμού ανασυνδυαστικής επιδιόρθωσης μονόπλευρων διπλών θραύσεων του DNA - Break Induced Repair (BIR). Στην προτεινόμενη διατριβή θα διερευνήσουμε μηχανιστικά τις βιολογικές διεργασίες δημιουργίας εύθραυστων τελομερών κατά το επαγόμενο ή ενδογενές στρες της αντιγραφής σε καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιούν εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών απουσία της ρεκομπινάσης RAD52 ή της εξωνουκλεάσης EXD2 και σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού διπλού knock-out για τη βασική υπομονάδα της τελομεράσης Terc και τη Rad52. Παρότι η επαγωγή αντιγραφικού στρες μέσω Αφιδικολίνης αυξάνει την ευθραυστότητα των τελομερών, θραυσμένα τελομερή παρατηρούνται σε χρωμοσωμικά παρασκευάσματα περιφερικού αίματος υγείων ατόμων και δεν έχουν συνδεθεί με αυξημένη χρωμοσωμική ή τελομερική αστάθεια. Στην προτεινόμενη διατριβή πέραν του ο μηχανισμού βιογένεσης και επιδιόρθωσης των θραυσμένων τελομερών θα μελετηθούν οι βιολογικές επιδράσεις τους, στην ανάπτυξη γονιδιωματικής αστάθειας στον καρκίνο και τη πολλαπλασιαστική ικανότητα εμβρυϊκών κυττάρων. Τα αποτελέσματα της προτεινόμενης διατριβής θα συμβάλουν σημαντικά στην βαθύτερη κατανόηση της μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και της προστασίας των τελομερών των χρωμοσωμάτων ενώ αναμένεται ότι θα αναδείξουν νέα μόρια στόχους της εξατομικευμένης ιατρικής για την αποτελεσματική καταπολέμηση της κακοηθείας.

PhD Candidate: Papalouka Chariklia

Supervisor: 1) Gorgoulis Vassilios, 2) Athanasios Kotsinas, 3) Gagos Sarantis

Title of PhD thesis: Biological roles and elucidation of mechanisms of biogenesis and repair of fragile telomeres in human

ABSTRACT

Telomeres at the ends of linear chromosomes and the so-called common chromosomal fragile sites, are highly conserved regions of the genome that are hypersensitive to DNA replication stress. These sites are more vulnerable to chromosomal rearrangements and they have been linked both with carcinogenesis and the development of genomic instability that complicates any known oncotherapy. In accordance with the common fragile sites of the genome, the telomeres of cancer cells and cells under replication stress, exhibit a distinctive fluorescence microscopy phenotype after in situ hybridization, which is termed "fragile telomeres". FTs can be induced in cell cultures by aphidicolin, an inhibitor of DNA polymerase alpha, by overexpression of the oncogene Cyclin E or by depletion/silencing of genes encoding factors related to the structure or function of telomeres. These genes mainly concern proteins that help the advance of replication machinery and the extension of replication fork at telomeres. RecQL helicases play an important role in telomere replication; the absence of RecQL4 helicase and BLM protein lead to overexpression of the fragile- telomere phenotype. The FT phenotype seems to occur in S phase of the cell cycle, by homology mediated recombinatorial repair of one-sided double strand breaks via the activation of a yet unknown break induced replication repair pathway which engages conservative replication. In the proposed thesis we will investigate the biological processes involved in the generation of fragile telomeres during induced or endogenous replication stress in cancer cells using either of the two known ALT pathways in human cells knocked out for RAD52 or the nuclease EXD2, and in double knockout mouse embryonic fibroblasts for the basic subunit of telomerase, mTerc, and for mRad52.]. Although the induction of replication stress by aphidicolin increases telomeric fragility, fragile telomeres are also observed in peripheral blood cytogenetic preparations of normal individuals and they have not been linked to increased chromosomal or telomeric instability. In the proposed thesis, in addition to mechanisms of biogenesis and repair of fragile telomeres, we will study their biological effects in the development of genomic instability in cancer and in the proliferative ability of embryonic cells. The results of the proposed thesis will contribute significantly to a deeper understanding of DNA repair and telomere protection mechanisms, while it is expected to reveal new biomarkers and putative targets for personalized medicine employed in the fight against malignancy.