



Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - IMBB, ΙΤΕ



Μεταπτυχιακή Διατριβή

# Ο ρόλος της γενωμικής αστάθειας στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης

Ιωαννίδου Άννα

Υπεύθυνος Ερευνητής : Γιώργος Γαρίνης

Ηράκλειο, 2014

## Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Εισαγωγή	5
Επιδιορθωτικός μηχανισμός NER	6
NER σύνδρομα	9
Ζωικά μοντέλα των NER συνδρόμων	10
Ο ρόλος των πρωτεϊνών NER, πέρα από την επιδιόρθωση	11
Σκοπός	13
Υλικά και Μέθοδοι	15
Σειρές ποντικών και <i>in vivo</i> μελέτες	15
Απομόνωση μακροφάγων	16
Ανοσοφθορισμός	16
Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών	16
Ανοσοκατακρίμνηση (Immunoprecipitation, IP)	17
Απομόνωση RNA και real-time PCR	18
Αποτελέσματα	19
Δημιουργία ιστοειδικών <i>Ercc1</i> <sup>-/-</sup> σειρών στα μακροφάγα	19
Μεταβολικοί παράμετροι των macrophage-specific ko ποντικών	22
Λειτουργική ανάλυση των <i>Ercc1</i> -deficient μακροφάγων	25
Αλληλεπίδραση της <i>Ercc1</i> με ανοσολογικούς παράγοντες	28
Συζήτηση	29
Βιβλιογραφία	32

## Περίληψη

Η διατήρηση της γενωμικής ακεραιότητας είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα και για το λόγο αυτό υπάρχουν πολλοί και εξειδικευμένοι μηχανισμοί για την επιδιόρθωση του DNA. Η Ercc1 είναι μια πρωτεΐνη του επιδιορθωτικού μηχανισμού εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER). Μαζί με την XPF, σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές με ενδονουκλεολυτική δράση, συμβάλλοντας στην απομάκρυνση της βλάβης. Έλλειψη της Ercc1, τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ποντίκια, οδηγεί σε ένα πολύπλοκο και πολύ σοβαρό φαινότυπο πρόωρης γήρανσης. Αυτό καταδεικνύει ότι η Ercc1 συμμετέχει και σε κυτταρικές λειτουργίες, πέραν της επιδιόρθωσης των γενετικών βλαβών. Για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι η Ercc1 συμμετέχει και στη ρύθμιση της μεταγραφής, γεγονός που εξηγεί και ορισμένα από τα αναπτυξιακά προβλήματα των ασθενών με μεταλλάξεις στο NER. Πρόσφατα μελετήθηκε και ο μηχανισμός με τον οποίο η έλλειψη της Ercc1 οδηγεί σε απώλεια του λιπώδους ιστού, μέσω της επαγωγής φλεγμονής. Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε το ρόλο της Ercc1 στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας, δημιουργήσαμε ένα ιστοειδικό μοντέλο ποντικού, όπου η Ercc1 έχει απαλειφθεί στα κύρια κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, τα μακροφάγα. Τα πειράματα έδειξαν ότι η Ercc1 επηρεάζει την λειτουργικότητα των μακροφάγων, καθώς παρατηρήθηκε επαγωγή των προφλεγμονωδών αποκρίσεων. Επίσης, σε οργανισμικό επίπεδο, η παρουσία μακροφάγων με μη λειτουργικό NER μηχανισμό, είχε ως αποτέλεσμα μεταβολικές διαταραχές, όπως αλλαγές του βάρους και περιορισμένη ικανότητα ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης. Η παρούσα μελέτη, σε συνδυασμό με περαιτέρω πειράματα, θα συμβάλει στην κατανόηση των μηχανισμών που συνδέουν τη γενωμική αστάθεια με τη ρύθμιση της ανοσολογικής και άλλων συστημικών αποκρίσεων, που τελικά οδηγούν στην πολύπλοκη παθολογία των NER συνδρόμων.

**Λεξεις κλειδιά :** Επιδιορθωτικός μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων, γενωμική αστάθεια, Ercc1, μακροφάγα, μεταβολικές διαταραχές, φλεγμονή

## **Abstract**

The maintenance of genome integrity is of vital importance for the cells and for this reason, there are distinct and specialized mechanisms that repair DNA. Ercc1 is a protein of the NER pathway. Together with XPF, they form a heterodimer with endonucleolytic action, that contributes to the removal of the DNA lesion. Absence of Ercc1, both in humans and in mice, leads to a complex and severe phenotype of premature aging (progeria). This points to additional roles of Ercc1, beyond NER. Indeed, it has been shown that Ercc1 is also involved in the regulation of gene expression, which explains the developmental defects of the patients. In a recent study, the mechanism by which absence of Ercc1 leads to fat depletion, through induction of inflammation, was described. In an attempt to study the role of Ercc1 in the induction of innate immune response, we created a tissue-specific mouse model, where Ercc1 was depleted from the major innate immune cells, macrophages. The results showed that Ercc1 plays a role in macrophages function, since there was an induction of the proinflammatory responses. In addition, at an organismal level, the presence of NER-defective macrophages, resulted in metabolic alterations, such as weight changes and reduced capacity to regulate glucose levels. The present study, together with further experiments, will contribute to our understanding of the mechanisms mediating genome instability and the regulation of the immune and other systemic responses that ultimately lead to the complex pathology of the NER syndromes.

**Key words :** Nucleotide excision repair, genome instability, Ercc1, macrophages, netabolic disorders, inflammation

## Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα αποτελούν τα δομικά στοιχεία των κυττάρων. Τα βιομόρια αυτά, είναι συνεχώς εκτεθειμένα και βάλλονται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην αλλαγή της χημικής δομής τους ή ακόμη και στην καταστροφή τους. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το RNA, το DNA, ο φορέας της γενετικής πληροφορίας, δεν επανασυντίθεται. Συνεπώς, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά συντηρημένων μηχανισμών που διασφαλίζουν την επιδιόρθωση και τη διατήρηση της χημικής δομής του DNA. Οι μηχανισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση ως προς τον τύπο της βλάβης που αναγνωρίζουν και επιδιορθώνουν. Για παράδειγμα, οι θραύσεις επιδιορθώνονται από τον μηχανισμό ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination, HR) ή μέσω συγκόλλησης των δύο ακρών της θραύσης (Non-homologous End Joining, NHEJ). Δομικές μεταβολές βάσεων (π.χ. απαμίνωση, αποπουρίνωση, οξειδωση κλπ.) αναγνωρίζονται και επιδιορθώνονται από το μηχανισμό εκτομής βάσεων (Base Excision Repair, BER), ενώ αλλοιώσεις της τριτοταγούς δομής του DNA (λόγω διμερών πυριμιδίνης ή ομοιοπολικής πρόσδεσης ογκωδών χημικών ομάδων) από το μηχανισμό εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER). Η σημασία των μηχανισμών αυτών για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και, κατ' επέκταση των οργανισμών, φαίνεται από το γεγονός ότι ενδεχόμενη απορύθμιση τους (π.χ. λόγω μεταλλαγών) οδηγεί σε γενομική αστάθεια, η οποία είναι συνδεδεμένη με αναπτυξιακές ανωμαλίες, πρόωρη γήρανση και διαφόρους τύπους καρκίνου (de Boer and Hoeijmakers, 2000, Niedernhofer, L. J. *et al.*, 2006 ).

## Επιδιορθωτικός μηχανισμός NER

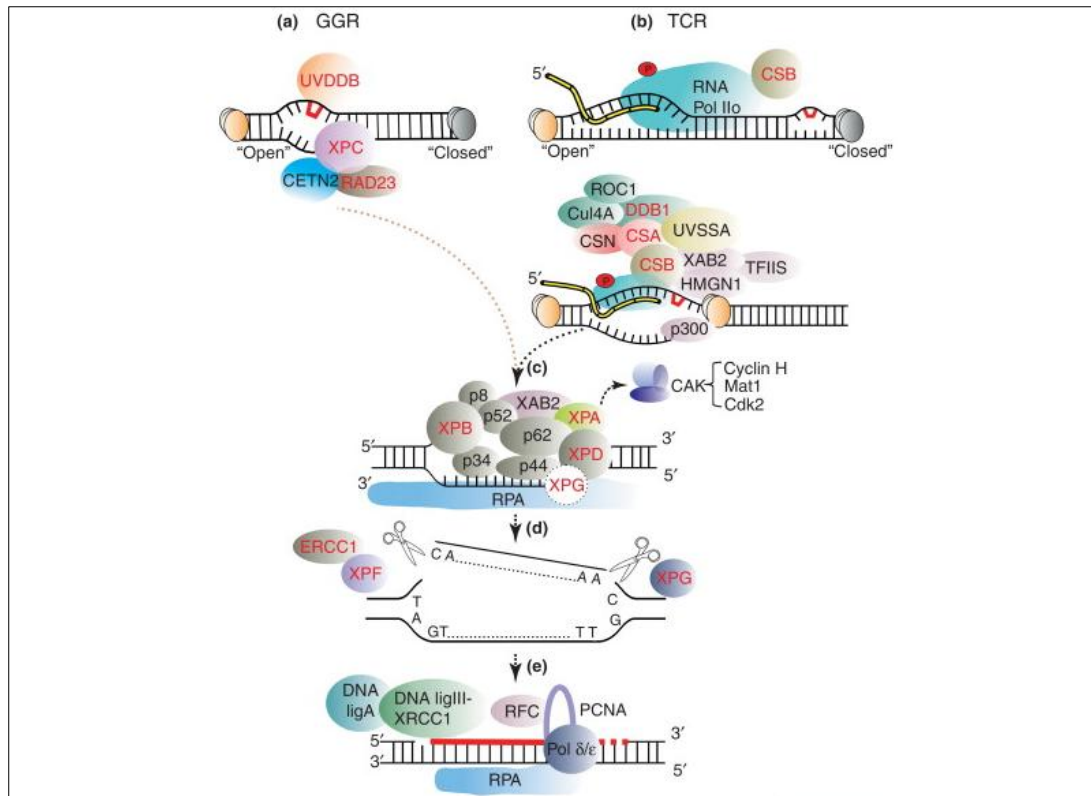
Ο μηχανισμός NER είναι ένα συντηρημένο μονοπάτι επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Αναγνωρίζει και επιδιορθώνει αλλοιώσεις της δομής της διπλής έλικας, όπως ογκώδη πρόσθετα και διμερή πυριμιδίνης, που είναι αποτέλεσμα της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (Hoeijmakers, 2001). Οι περίπου 30 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό δρουν σε τρία βασικά στάδια. Αυτό της αναγνώρισης της βλάβης, την εκτομή ενός νουκλεοτιδίου μήκους περίπου 30 βάσεων που περιέχει τη βλάβη και, τέλος, τη σύνθεση του τμήματος που αποκόπηκε (de Boer, J. and Hoeijmakers, J. H. , 2000). Ο μηχανισμός χωρίζεται σε δυο υπο-μονοπάτια, τα οποία διαφέρουν μόνο στο στάδιο της αναγνώρισης της βλάβης και έπειτα συγκλίνουν σε ένα κοινό μηχανισμό. Το ένα από αυτά αναγνωρίζει βλάβες σε ολόκληρο το γονιδίωμα και ονομάζεται Global Genome NER (GG-NER), ενώ το δεύτερο, στο μεταγραφόμενο τμήμα του γονιδιώματος (Transcription-Coupled NER, TC-NER) **(Εικόνα 1)**.

Κατά το GG-NER, το σύμπλοκο XPC-RAD23-CETN2, σαρώνει το DNA και αναγνωρίζει τη μικρή, μονόκλωνη περιοχή DNA που έχει προκύψει λόγω της αλλοιωμένης δομής του (Wood, R. D., 1999, Nishi, R. *et al.* , 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές, στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες UV-damaged DNA-binding proteins 1 and 2 (UV-DDB1, 2), που μαζί αποτελούν το σύμπλοκο UV-DDB (Yeh, J. I. *et al.*, 2012). Από τις δύο αυτές πρωτεΐνες, η DDB2 είναι αυτή που αναγνωρίζει και προσδένεται στο DNA (Fei, J. *et al.*, 2011). Η DDB1 αλληλεπιδρά με την Culin 4A (CUL4A) λιγάση ουβικτινίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αφενός, την ουβικτινιλίωση των ιστονών H2A, H3 και H4 και συνεπώς την χαλάρωση της δομής του DNA, ώστε να προσδεθούν και να δράσουν οι επιδιορθωτικοί παράγοντες και αφετέρου, την ουβικτινιλίωση της XPC. Αυτό οδηγεί στη σταθεροποίηση της XPC και την αύξηση της συγγένειας της για το DNA (Yeh, J. I. *et al.*, 2012, Wang, H. *et al.*, 2006). Κατά το TC-NER, η αναγνώριση της βλάβης γίνεται όταν η RNA-πολυμεράση δεν μπορεί να μεταγράψει λόγω της αλλοιωμένης δομής του DNA. Για να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι επιδιόρθωσης, απαιτείται η

στρατολόγηση των πρωτεϊνών Cockayne Syndrome group A and B (CSA και CSB, αντίστοιχα) (Laine and Egly, 2006, Fousteri, M. *et al.*, 2006). Η CSB είναι μια DNA-εξαρτώμενη ATPάση (Troelstra, C. *et al.*, 1992, Citterio, E. *et al.*, 1998). Εντοπίζεται με την σταματημένη RNA πολυμεράση, στα σημεία της βλάβης και είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση τόσο πρωτεϊνών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (όπως την ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών, p300), όσο και των υπόλοιπων πρωτεϊνών του NER (Fousteri, M. *et al.*, 2006). Η CSA είναι μέρος του συμπλόκου E3-λιγάσης ουβικιτίνης, το οποίο περιλαμβάνει και τις πρωτεΐνες DDB1, Cullin 4A (CUL4A) and Ring-box protein 1 (RBX1) (Groisman, R. *et al.*, 2003). Επίσης, η CSA (μαζί με τη CSB) στρατολογεί τις πρωτεΐνες nucleosomal binding protein high mobility group nucleosome binding domain 1 (HMGN1) (Birger, Y. *et al.*, 2003), XPA binding protein 2 (XAB2) (Nakatsu, Y. *et al.*, 2000) και TFIIS. Πρόσφατα, προσδιορίστηκε ο ρόλος μιας νέας πρωτεΐνης στο TC-NER. Συγκεκριμένα, δείχτηκε ότι η πρωτεΐνη UV-sensitive syndrome protein A (UV-SSA), μέσω των CSB και CSA, φέρνει την απο-ουβικιτινιλάση USP-7 στην περιοχή της πολυμεράσης (Schwertman, P. *et al.*, 2012), με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της CSB (Nakazawa, Y. *et al.*, 2012, Zhang, X. *et al.*, 2012).

Ανεξαρτήτως από το μηχανισμό αναγνώρισης, τα μετέπειτα στάδια του NER είναι κοινά. Μετά την αναγνώριση της βλάβης, απαιτείται το ξεδιπλωμα της διπλής έλικας γύρω από την περιοχή της βλάβης. Αυτό γίνεται από το μεταγραφικό παράγοντα TFIIH, οποίος είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Μερικές από τις υπομονάδες του είναι οι πρωτεΐνες XPB, XPD, XPG, p8, p34, p44, p62 και το σύμπλοκο Cdk-activating-kinase (CAK) (Compe, E. And Egly, J. M., 2012). Οι δύο ελικάσες, XPD και XPB, η οποία είναι μια ATPάση, ξεδιπλώνουν το DNA, δημιουργώντας μια μονόκλωνη περιοχή μήκους ~27 νουκλεοτιδίων, η οποία σταθεροποιείται από τις πρωτεΐνες XPA και RPA. Η τελευταία ενεργοποιεί τις ενδονουκλεάσες XPG και ERCC1/XPF, οι οποίες κόβουν το νουκλεοτίδιο 22-30 βάσεων, που περιέχει τη βλάβη, στο 5' και 3' άκρο, αντίστοιχα. Το κενό που προκύπτει συμπληρώνεται από τις DNA πολυμεράσες δ, ε ή κ, των οποίων η ενεργότητα ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες

PCNA και RFC. Τέλος, το νεοσυντιθέμενο τμήμα ενώνεται με το DNA από την DNA λιγάση I ή από την DNA λιγάση III, μαζί με την πρωτεΐνη XRCC1 (Marteijn, J.A. *et al.*, 2014, Ogi, T. *et al.* 2010, Kamileri, I. *et al.*, 2012).



**Εικόνα 1. Μονοπάτι εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER).** Κατά το Global Genome NER (GGR) αναγνωρίζονται βλάβες σε όλο το γονιδίωμα. Οι βλάβες που εντοπίζονται στο μεταγραφόμενο τμήμα του γονιδιώματος, ανιχνεύονται κατά το Transcription Coupled NER (TCR). Μετά την αναγνώριση, τα δύο υπομονοπάτια ενώνονται και ακολουθείται ένας κοινός μηχανισμός, που οδηγεί στην εκτομή του τμήματος που φέρει τη βλάβη και στη σύνθεση DNA (Kamileri *et al.* 2012).



## NER Σύνδρομα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA είναι πολύ συντηρημένοι, έτσι ώστε οι τα κύτταρα να διασφαλίζουν τη γενωμική τους ακεραιότητα και, κατ' επέκταση, τη λειτουργικότητά τους. Επίσης, το γεγονός ότι μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των επιδιορθωτικών μηχανισμών οδηγούν σε σοβαρές διαταραχές, καταδεικνύουν τη σημαντικότητα των μηχανισμών αυτών.

Μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του NER έχουν ως αποτέλεσμα σοβαρές δυσλειτουργίες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε τρία σύνδρομα : Μελαγχρωματική ξηροδερμία (*Xeroderma pigmentosum*, XP), Σύνδρομο Cockayne (*Cockayne syndrome*, CS) και Τριχοθειοδυστροφία (*Trichothiodystrophy*, TTD). Κάθε ένα από τα σύνδρομα αυτά οφείλεται σε μεταλλαγές διαφορετικών γονιδίων και χαρακτηρίζεται από διαφορετική παθολογία. Ακόμη και μεταλλαγές στο ίδιο γονίδιο μπορούν να δώσουν διαφορετικό φαινότυπο. Παρ' όλα αυτά, κοινός παρονομαστής και των τριών συνδρόμων είναι η αυξημένη ευαισθησία σε υπεριώδη ακτινοβολία. (Lehmann, A. R, 2003, de Boer, J. and Hoeijmakers, J. H. , 2000).

Ασθενείς με XP, φέρουν μεταλλαγές σε 7 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του μηχανισμού NER (*Xpa-Xpg*). Ο κύριος φαινότυπος των ασθενών είναι οι >1000 φορές περισσότερες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος (DiGiovanna, J. J., 2012). Αντίθετα, το σύνδρομο Cockayne, που οφείλεται σε μεταλλαγές των TC-NER πρωτεϊνών, *Csb* και *Csa* και η Τριχοθειοδυστροφία, που προκύπτει από μεταλλαγές στα γονίδια *Xpb*, *Xpd* και *Ttd-a*, χαρακτηρίζονται από αναπτυξιακές διαταραχές και τμηματική πρόωρη γήρανση - προγηρία. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ασθενών είναι η καχεξία, υπογοναδισμός, νευροεκφυλισμός, καταρράκτης, σκελετικές διαταραχές (κύφωση) και χαμηλό ποσοστό υποδόριου λίπους. Ασθενείς με TTD εμφανίζουν επιπλέον ιχθύωση στο δέρμα, εύθραυστα νύχια και τρίχες, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις ασθενών που διαθέτουν συνδυασμό συμπτωμάτων XP και CS ή TTD (XP/CS, XP/TTD) (Kraemer, K. H. *et al.*, 2007, Itin, P. H. *et al.*, 2001).

Αν και τα σύνδρομα XP, CS και TTD είναι οι τρεις κύριες κατηγορίες διαταραχών του μηχανισμού NER, έχουν χαρακτηριστεί και άλλες περιπτώσεις ασθενών. Για παράδειγμα, πρόσφατα χαρακτηρίστηκε μια περίπτωση ασθενούς με μεταλλαγή στο γονίδιο της XPF, ο οποίος δεν είχε συμπτώματα του XP, αλλά υπέφερε από νευρολογικά, μυοσκελετικά και αιμοποιητικά προβλήματα. Η περίπτωση αυτή θεωρήθηκε διαφορετική και χαρακτηρίστηκε ως XFE σύνδρομο (Niedernhofer, L. J. *et al.*, 2006). Ένα ακόμη ξεχωριστό χαρακτηριστικό των NER συνδρόμων είναι ότι μεταλλαγές ακόμη και στο ίδιο γονίδιο μπορούν να οδηγήσουν σε τελείως διαφορετικούς φαινότυπους. Συγκεκριμένα, η ίδια μεταλλαγή στο γονίδιο της CSB μπορεί να προκαλέσει είτε την τυπική μορφή του CS, είτε μια μορφή του XP συνδρόμου το οποίο χαρακτηρίζεται και από νευρολογικές διαταραχές και έχει ονομαστεί σύνδρομο DeSanctis-cacchione (DSC) (Colella, S. *et al.*, 2000).

#### Ζωικά μοντέλα των NER συνδρόμων

Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμα στη μελέτη των επιπτώσεων της γενομικής αστάθειας και των μηχανισμών που επηρεάζονται όταν κάποιο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA, όπως για παράδειγμα το NER, είναι μη λειτουργικό. Έχουν δημιουργηθεί ποντίκια, τα οποία φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια είτε του GG-NER, είτε του TC-NER, είτε και των δύο. Κάποια από αυτά είναι τα ποντίκια *Xpc*<sup>-/-</sup>, *Xpa*<sup>-/-</sup>, *Erc1*<sup>-/-</sup>, *Xpf*<sup>-/-</sup>, *Csa*<sup>-/-</sup>, *Csb*<sup>-/-</sup> και *Xpg*<sup>-/-</sup>. Τα περισσότερα από αυτά τα μοντέλα παρουσιάζουν πιο ήπιο φαινότυπο από τον αντίστοιχο των ασθενών. Για παράδειγμα, τα ποντίκια *Xpc*<sup>-/-</sup>, *Xpa*<sup>-/-</sup>, *Csa*<sup>-/-</sup> και *Csb*<sup>-/-</sup> δεν εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα των αντίστοιχων συνδρόμων, όπως για παράδειγμα νευροεκφυλισμό (van der Horst, G. T. *et al.*, 2002, Cheo, D. L. *et al.*, 1997). Παρόλα αυτά, όταν διασταυρωθούν τα *Xpa*<sup>-/-</sup> ή *Xpc*<sup>-/-</sup> ποντίκια με τα *Csb*<sup>-/-</sup>, ο φαινότυπος που προκύπτει είναι πολύ σοβαρός και προσομοιάζει κατά πολύ αυτόν των XP-A και/ή CS-B ασθενών. Συγκεκριμένα τα ποντίκια αυτά πάσχουν από καθυστερημένη ανάπτυξη, νευρολογικά προβλήματα και μειωμένο χρόνο ζωής (Murai, M. *et al.*, 2001). Επίσης, τα ποντίκια *Erc1*<sup>-/-</sup>

αποτελούν μοντέλο για το XFE σύνδρομο, καθώς εμφανίζουν συμπτώματα πρόωρης γήρανσης, αταξία, κύφωση, καχεξία, δερματικές, ηπατικές και αιμοποιητικές ανωμαλίες (Prasher, J. M. *et al.*, 2005, Weeda, G. *et al.*, 1997, McWhir, J. *et al.*, 1993). Αυτός ο δραματικός φαινότυπος θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η Ercc1 συμμετέχει και στην επιδιόρθωση των Interstrand Crosslinks (ICLs). Τέλος, κάποια μοντέλα ποντικών στα οποία έχουν απαλοιφθεί γονίδια πρωτεϊνών του μονοπατιού NER δεν είναι βιώσιμα, όπως για παράδειγμα το Hr23b<sup>-/-</sup> και το Xab2<sup>-/-</sup> (Niedernhofer L.J. *et al.*, 2004).

#### Ο ρόλος των πρωτεϊνών NER, πέρα από την επιδιόρθωση

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, μεταλλάξεις σε γονίδια των πρωτεϊνών του μηχανισμού NER οδηγούν σε ένα μεγάλο εύρος συμπτωμάτων. Το ίδιο ισχύει και για μεταλλάξεις ακόμη και στο ίδιο γονίδιο. Επίσης, η βαρύτητα των συμπτωμάτων και οι αναπτυξιακές διαταραχές μπορούν μόνο εν μέρει να εξηγηθούν από τη συσσώρευση βλαβών στο DNA (Kamileri, I. *et al.*, 2012). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι πρωτεΐνες του NER έχουν βρεθεί να συμμετέχουν και σε άλλους μηχανισμούς, πέρα από αυτόν της επιδιόρθωσης του DNA.

Για παράδειγμα, το σύμπλοκο λιγάσης ουβικιτίνης CUL4-DDB-ROC1, ουβικιτινιλιώνει τις ιστόνες H3 και H4, ως απόκριση σε υπερϊώδη ακτινοβολία, και συμβάλλει στην στρατολόγηση των πρωτεϊνών XPC/RAD23B στο σημείο της βλάβης (Wang, H *et al.*, 2006). Ομοίως, το σύμπλοκο UV-DDB, που συμμετέχει στην αναγνώριση της βλάβης κατά το GG-NER, οδηγεί στην μονο-ουβικιτινιλύωση της ιστόνης H2A στην περιοχή γύρω από την βλάβη (Karpetanaki, M.J. *et al.*, 2006). Επίσης, η πρωτεΐνη του TC-NER, CSB, περιέχει μία επικράτεια DNA-εξαρτώμενης ATPάσης (Citterio, E. *et al.*, 1998). Αυτές οι επικράτειες είναι χαρακτηριστικό της οικογένειας πρωτεϊνών SWI/SNF2, οι οποίες αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη. Το ίδιο ισχύει και για τη CSB, καθώς έχει δείχθει ότι η επικράτεια αυτή είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση

βλαβών, όπως και για την αναδιαμόρφωση της χρωματινής *in vitro* (Citterio, E. *et al.*, 2000, Cho, I. *et al.*, 2013).

Η πρώτη σύνδεση του μηχανισμού NER και της μεταγραφής έγινε όταν ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIH, και συγκεκριμένα οι υπομονάδες του XPB και XPD, βρέθηκε να συμμετέχει στον επιδιορθωτικό μηχανισμό NER (L. Schaeffer *et al.*, 1993). Από τότε, πολλές μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή πολλών NER πρωτεϊνών στη μεταγραφή. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες XPC, CSB, XPA, XPG και ERCC1/XPF εντοπίζονται με την RNAPolIII στους υποκινητές γονιδίων πυρηνικών υποδοχέων, απουσία βλαβών (Le May, N. *et al.*, 2010). Επίσης, το σύμπλοκο του GG-NER, XPC/RAD23B/CETN2 δρα ως συνενεργοποιητής των μεταγραφικών παραγόντων Oct4/Sox2 σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα (Fong, Y. W. *et al.*, 2011). Τέλος, έχειδειχθεί ότι το σύμπλοκο Ercc1/XPF, αλληλεπιδρά με τις TBP (TATA-binding protein) και TAFs (TBP-associated factors), στρατολογείται σε υποκινητές γονιδίων που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη και βοηθά στην απομεθυλίωση του DNA στην περιοχή του υποκινητή (Kamileri, I. *et al.*, 2012).

Το γεγονός ότι η Ercc1 βρέθηκε να σχετίζεται με σημαντικά για την ανάπτυξη γονίδια, δίνει μια εξήγηση στα αναπτυξιακά προβλήματα των Ercc1/-ποντικών. Συγκεκριμένα, τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τους τρεις βασικούς ορμονικούς άξονες του ζώου, δηλαδή τον σωματοτροπικό, θυρεοτροπικό και λακτοτροπικό άξονα. Αντίθετα, έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης γονιδίων της σύνθεσης γλυκογόνου και λιπαρών οξέων, καθώς και γονιδίων απόκρισης σε οξειδωτικό στρες (Niedernhofer, L. J. *et al.*, 2006). Όλα αυτά δείχνουν μια μεταβολική μετατόπιση από την ανάπτυξη στην αποθήκευση ενέργειας και διατήρηση του σώματος, γεγονός που είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αύξηση της ηλικίας σε φυσιολογικά ποντίκια.

## Σκοπός

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι συσσώρευση βλαβών του DNA και η γενωμική αστάθεια, μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης (Gasser, S. and Raulet, D. H., 2006). Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη των Chen και συνεργατών, η έλλειψη της *Ercc1* είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινοτύπου SASP (Senescence-associated secretory phenotype), με χαρακτηριστική επαγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και του μηχανισμού της έμφυτης ανοσίας (Chen, Q. *et al.*, 2013). Η απόκριση αυτή μεσολαβείται από τον παράγοντα NF-κB, ο οποίος είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές της φλεγμονώδους απόκρισης, μεταξύ άλλων.

Ένα από τα συμπτώματα που εμφανίζει το *Ercc1*<sup>-/-</sup> ποντίκι είναι η απώλεια του σπλαχνικού λιπώδους ιστού. Πρόσφατα, μελετήθηκε ο ρόλος της *Ercc1* και της γενωμικής αστάθειας στη φυσιολογία του λευκού λιπώδους ιστού και ο μηχανισμός που οδηγεί στην απώλεια του στα *Ercc1*<sup>-/-</sup> ποντίκια (Karakasilioti, I. *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ένα ιστοειδικό *Ercc1*<sup>-/-</sup> ποντίκι, όπου η *Ercc1* έχει απαλειφθεί μόνο στα ώριμα λιποκύτταρα, περιγράφηκε ένας μηχανισμός, κατά τον οποίο η έλλειψη της *Ercc1* οδηγεί στην αποκαταστολή προφλεγμονωδών κυτοκινών, στη διήθηση μακροφάγων και τελικά στην καταστροφή του λιπώδους ιστού.

Συμπερασματικά, η απουσία της *Ercc1* οδηγεί σε συστημικές αποκρίσεις και πρόωρη γήρανση, μέσω ενδογενών ή/και εξωγενών μηχανισμών (cell-autonomous και non-cell autonomous, αντίστοιχα). Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι και η επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού. Παρόλα αυτά, παραμένει άγνωστο αν αυτό αποτελεί μια απόκριση προσαρμογής στην παρουσία κυττάρων που φέρουν γενετικές βλάβες ή αν καταδεικνύει την άμεση συμμετοχή πρωτεϊνών της επιδιόρθωσης του DNA στην ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η περιγραφή του ρόλου της *Ercc1* στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας. Χρησιμοποιώντας το σύστημα Cre/LoxP, δημιουργήσαμε

ένα ιστοειδικό knock-out ποντίκι, το οποίο έφερε απαλοιφή της *Ercs1* συγκεκριμένα στα μακροφάγα, τα οποία αποτελούν το βασικό κυτταρικό πληθυσμό που μεσολαβεί την έμφυτη ανοσία.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Σειρές ποντικών και *in vivo* μελέτες

Για τη δημιουργία ποντικών που φέρουν έλλειψη της *Erc1* ειδικά στα μακροφάγα (macrophage-specific *Erc1* ko), τα C57BL/6J *Lys2-Cre* ποντίκια διασταυρώθηκαν με C57BL/6J *Erc1*<sup>+/-</sup>. Οι απόγονοι *Lys2-Cre ; Erc1*<sup>+/-</sup>, διασταυρώθηκαν, στη συνέχεια, με ποντίκια FVB *Erc1*<sup>LoxP/LoxP</sup>, που φέρουν loxP sites και στα δύο αλληλία του γονιδίου της *Erc1* (εξόνια 7-10), ώστε να προκύψουν τα *Lys2-Cre ; Erc1*<sup>LoxP/-</sup> (ko) ποντίκια και τα αντίστοιχα controls τους *Lys2-Cre ; Erc1*<sup>LoxP/+</sup> (Hets) και *Erc1*<sup>LoxP/+</sup> (wt). Η γονοτυπική ταυτοποίηση των ποντικών έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Γονίδιο	F primer	R primer
<b>Erc1</b>	5'-TCAAAGTATGGTAGCCAAGGCAGC- 3'	5'- TGCAGAGCCTGGGGAAGAACTTCGC-3'
<b>Cre</b>	5'-GCGGTCTGGCAGTAAACTATC-3'	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3'

Στον 2<sup>ο</sup> μήνα, τα ποντίκια χωρίστηκαν (n=24, 14 wt και 10 ko) σε 2 groups. Στο ένα χορηγήθηκε κανονική τροφή (normal chow), ενώ στο άλλο τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Protein 17%, Fat 34%, Carbohydrate approximately 45% with Fiber 5%, Mucedola, Settimo Milanese, MI, Italy). Τα ποντίκια ζυγίζονταν μια φορά τη βδομάδα, για 24 εβδομάδες. Στους 2, 4 και 6 μήνες από τη χορήγηση της HFD μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα όλων των ποντικών. Συγκεκριμένα, 6 ώρες πριν από τη μέτρηση, αφαιρέθηκε η τροφή από τα ποντίκια. Στη συνέχεια, ενέθηκαν ενδοπεριτονιακά με 1 g/kg του βάρους, 35% διάλυμα δεξτρόζης. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έγινε με μετρητή γλυκόζης (Bayer Pharmaceuticals) στα 15, 30, 45, 60, 120 και 180 λεπτά από την ένεση δεξτρόζης.

### Απομόνωση μακροφάγων

Για την απομόνωση μακροφάγων, τα ποντίκια ενέθηκαν με 4% θειογλυκολικό (Thioglycollate medium (Brewer), LabM, UK). Μετά από τρεις ημέρες, θυσιάστηκαν με εξάρθρωση του αυχένα και έγινε πλύση της ενδοπεριτοναϊκής κοιλότητας με 10ml DMEM. Τα μακροφάγα έμειναν 16-18 ώρες (overnight) σε καλλιέργεια και την επόμενη μέρα χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση RNA ή ανοσοφθορισμό.

### Ανοσοφθορισμός

Τα πειράματα ανοσοφθορισμού έγιναν όπως έχει περιγραφθεί (Nishimura, S. *et al.*, 2007, Karakasilioti, I. *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και ο λιπώδης ιστός αφαιρέθηκε και κόπηκε σε μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια, έγινε μονιμοποίηση σε 4% φορμαλδεύδη και 1% BSA για 30 λεπτά, επώαστηκαν με 0.1% Saponin, 3% calf serum και 1% BSA (B1 διάλυμα) και έμειναν overnight σε B1 διάλυμα που περιείχε την κατάλληλη αραιώση αντισωμάτων. Τέλος, επώαστηκαν με B1 διάλυμα που περιείχε τα δευτέρα αντισώματα στην κατάλληλη αραιώση, μαζί με ειδική χρωστική για τον πυρήνα (TOPRO) και για σταγονίδια λιπιδίων (BODIPY) (Molecular Probes). Για τη χρώση κυττάρων, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το ίδιο με τη διαφορά ότι το B1 περιείχε 0.1% Triton-X, αντί για saponin. Η οπτικοποίηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP2 SE.

### Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών, οι εκάστοτε ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα σουκρόζης (15 mM HEPES-KOH pH=7.9, 0.32 M Sucrose, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% BSA, 0.1% NP-40, 0.7-1 mM DTT, 1 mM PMSF, PIC, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine), επώαστηκαν με NP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40 with 1 mM PMSF) για 10 λεπτά και στη συνέχεια με υπέρτονο διάλυμα/High salt byffer (10 mM HEPES, 380 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM , EDTA, 20% Glycerol with protease inhibitors, 1mM PMSF



and 1mM DTT), για 1 ώρα. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 30 λεπτά, το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Για την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών από κύτταρα, τα στάδια ήταν τα ίδια, με εξαίρεση το αρχικό στάδιο του διαλύματος σουκρόζης.

#### Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation, IP)

Αφού τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα είχαν ποσοτικοποιηθεί, 1.5mg συνολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε και επώαστηκε με 100μl σφαιρίδια σεφαρόζης (Sepharose beads), τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με 1ml διαλύματος HENG (10 Hepes-KOH, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM EDTA, 20% glycerol with 1 mM PMSF), που περιείχε 200μg/ml Chicken egg albumin (blocking), και 5μg/500μg πυρηνικού εκχυλίσματος anti-Ercc1 αντίσωμα (Santa Cruz), overnight, στους 4°C, σε ρόδα ανακίνησης. Την επόμενη μέρα, το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες που δεν αλληλεπιδρούν με την Ercc1 (Flowthrough) απομακρύνθηκε και τα σφαιρίδια πλύθηκαν 5 φορές με HENG wash buffer (10 Hepes-KOH, pH=9.0, 300 mM KCl, 0.3% NP-40, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM EDTA, 20% glycerol with 1 mM PMSF and protease inhibitors) για 5 λεπτά, στους 4°C, σε ρόδα ανακίνησης. Η έκλουση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνικών συμπλόκων έγινε με την προσθήκη 2x protein sample buffer και επώαση στους 85°C, για 15 λεπτά. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν σε 10% πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE gel). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση πρωτεϊνών ήταν ERCC1 (D-10) και TFIIIB (C-18) από την Santa-Cruz Biotechnology και rabbit anti-STAT6 από τη Cell Signaling.

### Απομόνωση RNA και real time PCR

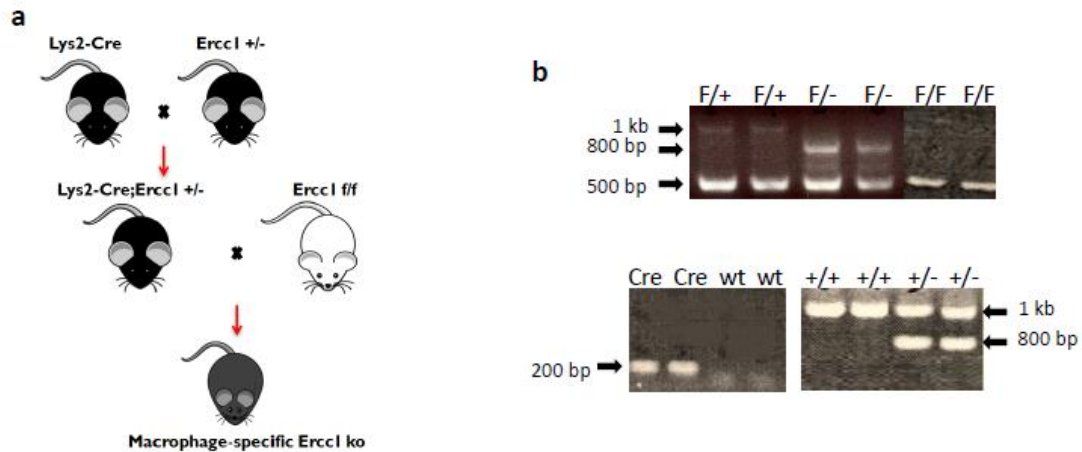
Για την απομόνωση RNA από τα μακροφάγα, προστέθηκε στα κύτταρα TRIzol® (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε αντίδραση αντιστροφής μεταγραφάσης (Superscript™ II Reverse Transcriptase kit, Invitrogen) με τη χρήση oligo-dT (Invitrogen) και χρησιμοποιήθηκε 1 µg συνολικού RNA ανά αντίδραση. Για την αντίδραση real-time PCR, το κάθε cDNA δείγμα αραιώθηκε 5 φορές και χρησιμοποιήθηκε το SYBR® GREEN I (Sigma) Platinum® Taq DNA Polymerase PCR system (Invitrogen). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2.5µl από το αραιωμένο cDNA ως εκμαγείο και η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25µl. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Γονίδιο	F primer	R primer
IL6	5'-GAGACTTCCATCCAGTTGCC-3'	5'-TCATTTCCACGATTTCCCA-3'
iNOS	5'-CTCCCTATCTTGAAGCCCCG-3'	5'-GTTCCCTGATCCAAGTGCTGC-3'
Arg1	5'-ATCGTGTACATTGGCTTGCG-3'	5'-CAAAGCTCAGGTGAATCGGC-3'
HPRT	5'-CCCAACATCAACAGGACTCC-3'	5'-CGAAGTGTTGGATACAGGCC-3'

## Αποτελέσματα

### Δημιουργία ιστοειδικών *Ercc1*<sup>-/-</sup> σειρών στα μακροφάγα

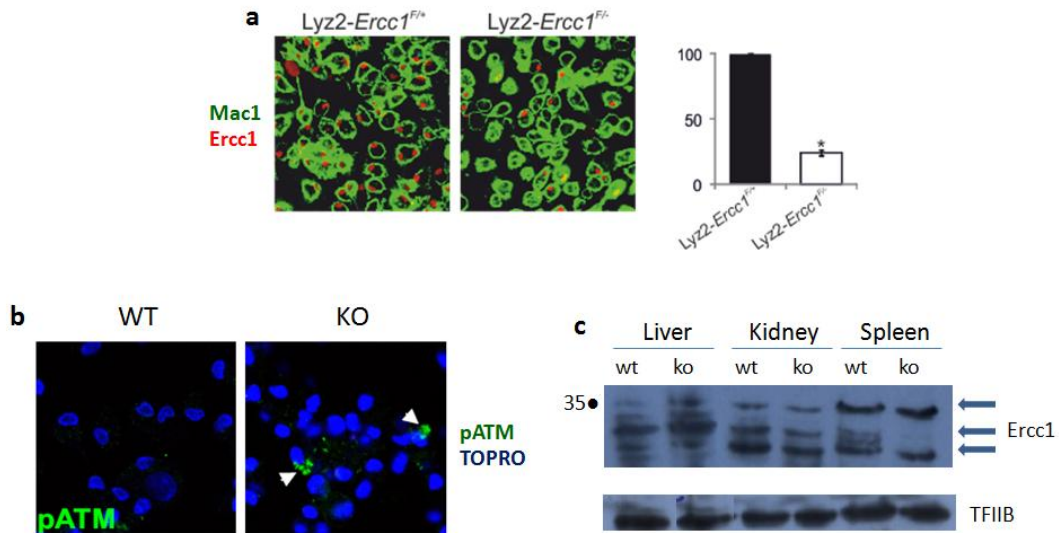
Τα μακροφάγα, μαζί με τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα, αποτελούν τα φαγοκυτικά κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Εκτός από το ρόλο τους στην απομάκρυνση παθογόνων και την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης, τα μακροφάγα συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Για το λόγο αυτό, η δυσλειτουργία τους έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη (νευρο)εκφυλιστικών και μεταβολικών ασθενειών. Λόγω της σύνθετης παθολογίας των *Ercc1*<sup>-/-</sup> ποντικών, χρησιμοποιήσαμε το Cre/LoxP σύστημα, ώστε να περιορίσουμε το φαινότυπο αυτό και να μελετήσουμε το ρόλο της *Ercc1* στα μακροφάγα και στην ανοσολογική απόκριση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε μια σειρά ποντικών που εκφράζουν την Cre recombinase υπό τον έλεγχο του υποκινητή *LysM* (*Lysozyme M*) ή αλλιώς *Lys2*. Αυτό εξασφαλίζει την έκφραση της Cre μόνο σε κύτταρα της μονοκυτταρικής γενεαλογίας/ μακροφάγα (Clausen, B. E. *et al.*, 1999). Για την ιστοειδική αφαίρεση της *Ercc1* στα κύτταρα αυτά, τα C57BL/6J *Lys2*-Cre ποντίκια διασταυρώθηκαν με C57BL/6J *Ercc1* +/- ποντίκια. Οι *Lys2*-Cre; *Ercc1* +/- απόγονοι, στη συνέχεια, διασταυρώθηκαν με FVB *Ercc1*<sup>LoxP/LoxP</sup> ποντίκια, οδηγώντας στη δημιουργία των *Lys2*-Cre; *Ercc1*<sup>LoxP/-</sup> ποντικών τα οποία φέρουν έλλειψη της *Ercc1* στα μακροφάγα (Macrophage-specific *Ercc1* ko) (**Εικόνα 2a**). Οι απόγονοι *Lys2*-Cre; *Ercc1*<sup>LoxP/+</sup> χρησιμοποιήθηκαν ως ετερόζυγα controls (Heterozygous, Het), ενώ τα ποντίκια *Ercc1*<sup>LoxP/+</sup> ως controls αγρίου τύπου (wild type, wt). Ο γενετικός έλεγχος των ποντικών έγινε με αλυσιδωτή ατίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), με τη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων (primers) για το γονίδιο της Cre ή της *Ercc1*. Στην περίπτωση της Cre, το αποτέλεσμα της PCR είναι μια ζώνη των ~200 βάσεων (bp), ενώ για την *Ercc1*, οι ζώνες είναι 500bp (αλλήλιο LoxP), 800bp (ko αλλήλιο) και 1000bp (wt αλλήλιο) (**Εικόνα 2b**).



**Εικόνα 2. Απαλοιφή του Ercc1 γονιδίου στα μακροφάγα.** (a) Για τη δημιουργία ποντικών που φέρουν μακροφάγα με έλλειψη της Ercc1, ποντίκια  $Ercc1^{LoxP/LoxP}$  διασταυρώθηκαν με  $Ercc1 +/-$ . Οι  $Ercc1^{LoxP/-}$ , στη συνέχεια, διασταυρώθηκαν με  $Lys2-Cre$  ποντίκια. Ως αποτέλεσμα, η έκφραση της Cre υπό τον έλεγχο του  $Lys2$  υποκινητή, ο οποίος εκφράζεται ειδικά στα μακροφάγα, οδήγησε στη δημιουργία  $Lys2-Cre ; Ercc1^{LoxP/-}$  ποντικών. (b) Η ταυτοποίηση του γονοτύπου των ζώων έγινε με απομόνωση του DNA και ακολούθως με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Με βέλη φαίνονται τα μοριακά βάρη των PCR προϊόντων.

Η ανίχνευση της απαλοιφής της Ercc1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο έγινε με πειράματα ανοσοφθορισμού. Συγκεκριμένα, 3 μέρες μετά από ένεση θειογλυκολικού, τα περιτονικά μακροφάγα απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν για 2 μέρες και βάφτηκαν για δείκτες μακροφάγων ( $cd11b$ ,  $Mac1$ ) και για Ercc1 (Εικόνα 3a). Όπως ήταν αναμενόμενο, η έκφραση της Ercc1 ήταν μειωμένη κατά ~80% στα ko ζώα σε σχέση με τα ετερόζυγα controls. Λόγω της έλλειψης της Ercc1, τα μακροφάγα αυτά παρουσίαζαν συσσώρευση βλαβών του DNA και ενεργοποίηση των μηχανισμών απόκρισης σε αυτές (DNA damage response, DDR), όπως φάνηκε από pATM ανοσοφθορισμό (staining) (Εικόνα 3b). Επίσης, ο αριθμός και η μορφολογία των μακροφάγων από τα  $Lys2-Cre;Ercc1^{LoxP/-}$  ήταν συγκρίσιμα με αυτά από τα  $Lys2-Cre;Ercc1^{LoxP/+}$  ποντίκια. Τέλος, η απαλοιφή της Ercc1 ήταν περιορισμένη στα μακροφάγα, καθώς στόπωμα κατά Western (Western blot), έδειξε ότι τα επίπεδα της Ercc1

σε άλλους ιστούς ήταν παρόμοια μεταξύ wt/het και ko ζώων (Εικόνα 3c). Όλα τα ζώα, τόσο τα wt, όσο και τα ko, αναπτύσσονταν φυσιολογικά, χωρίς κάποιο αναπτυξιακό πρόβλημα και ήταν γόνιμα.

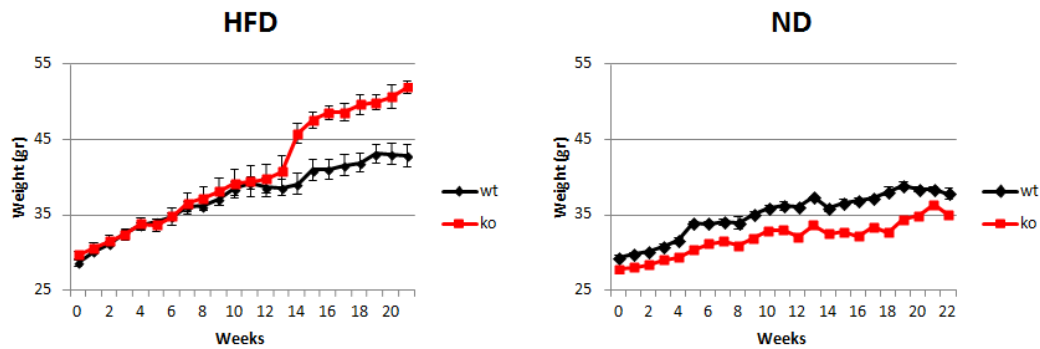


**Εικόνα 3. Απαλοιφή της Ercc1 στα μακροφάγα. (a)** Μετά από απομόνωση των περιτοναϊκών μακροφάγων, ακολούθησαν πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της Ercc1 ήταν μειωμένα στα ko ζώα, κατά 80%. **(b)** Η απαλοιφή της Ercc1 στα μακροφάγα είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση γενετικών βλαβών, όπως φαίνεται από την επαγωγή DDR και την ύπαρξη φωσφορυλιωμένης pATM. **(c)** Western blot από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαφόρων ιστών, έδειξε ότι η απαλοιφή της Ercc1 ήταν ειδική στα μακροφάγα, καθώς τα επίπεδά της ήταν ίδια μεταξύ των wt και ko ποντικών, σε άλλους ιστούς.

### Μεταβολικοί παράμετροι των macrophage specific ko ποντικών

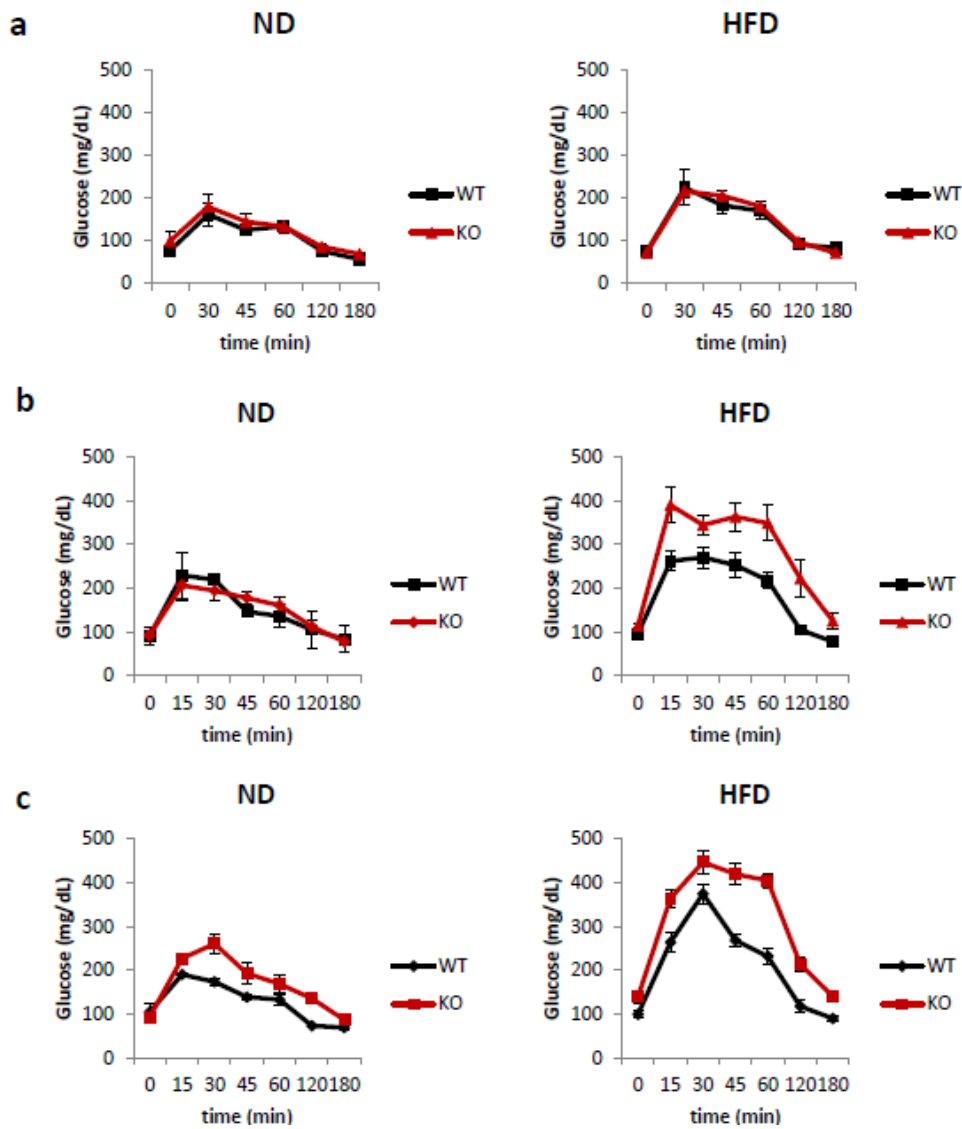
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ιστοειδική απαλοιφή της *Erc1* στα ώριμα λιποκύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεταβολικών διαταραχών, όπως για παράδειγμα ανοχή στη γλυκόζη (Glucose Tolerance, GT). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα μακροφάγα συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού και για το λόγο αυτό, η απορρύθμισή τους έχει συσχετισθεί με μεταβολικές διαταραχές (Chawla, A. *et al.*, 2011). Για το λόγο αυτό, ελέγξαμε τις επιπτώσεις της έλλειψης της *Erc1* στα μακροφάγα σε μεταβολικό επίπεδο. Παράλληλα με ζώα στα οποία χορηγήθηκε τροφή με φυσιολογική περιεκτικότητα σε λιπαρά (normal chow diet, ND), μελετήσαμε τις παραμέτρους και σε ποντίκια που λάμβαναν τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (High Fat Diet, HFD).

Αρχικά μελετήσαμε τις αλλαγές στο βάρος των τεσσάρων group/ομάδων ποντικών (ND wt/ND ko και HFD wt/HFD ko) για διάστημα 21 εβδομάδων. Αν και η πρόσληψη τροφής μεταξύ των ζώων δε διέφερε, τα ko ποντίκια που τρέφονταν με ND ζύγιζαν λιγότερο από τα αντίστοιχα wt. Αντίθετα, όταν η τροφή ήταν υψηλή σε λιπαρά, ο φαινότυπος αυτός αντιστρεφόταν και, από τον τρίτο μήνα, τα ko ποντίκια παρουσίαζαν μια απότομη αύξηση βάρους (**Εικόνα 4**). Οι διαφορές του βάρους, δεν αποδίδονταν σε κάποια εμφανή μεταβολή της μάζας του λιπώδους ιστού. Περαιτέρω μελέτες θα χρειαστούν ώστε να προσδιορισθεί ο/οι ιστός/οί που αλληλεπιδρούν με τα μακροφάγα, οδηγώντας σε αυτή τη μεταβολική αλλαγή.



**Εικόνα 4.** Αλλαγές στο βάρος των *Macrophage-specific Ercc1 knock-out* ποντίκια. Το βάρος των ποντικών ελεγχόταν κάθε εβδομάδα, για 6 μήνες. Ενώ τα knock-out ποντίκια (n=5) εμφάνιζαν μειωμένο βάρος σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (n=7), όταν τα ζώα τρέφονταν με τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (HFD), παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση του βάρους των knock-out ποντικών (n=5), σε σύγκριση με τα control ποντίκια (n=7), ιδιαίτερα από τον 3<sup>ο</sup> μήνα από την έναρξη χορήγησης της HFD.

Επιπλέον, τα επίπεδα γλυκόζης στον ορό του αίματος των ποντικών αυτών μετρήθηκαν στους 2, 4 και 6 μήνες από τη στιγμή που άρχισαν οι μετρήσεις του βάρους και η χορήγηση της υψηλής σε λιπαρά τροφής. Συγκεκριμένα, στους 2 μήνες, τόσο τα ζώα που λάμβαναν φυσιολογική τροφή, όσο και τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε HFD, είχαν παρόμοια επίπεδα γλυκόζης (**Εικόνα 5a**). Αντίθετα, στους 4 μήνες, ενώ τα wt και τα ko ζώα του group ND παρουσίαζαν φυσιολογική ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης, τα ko ζώα που λάμβαναν HFD, εμφάνισαν ανοχή στη γλυκόζη σε σχέση με τα αντίστοιχα wt (**Εικόνα 5b**). Στους 6 μήνες, τόσο σε συνθήκες ND, όσο και σε συνθήκες HFD, τα ko ζώα χαρακτηρίζονταν από μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (**Εικόνα 5c**). Συμπερασματικά, η έλλειψη της *Ercc1* στα μακροφάγα οδηγούσε σταδιακές μεταβολικές μεταβολές, οι οποίες ήταν εντονότερες όταν τα ποντίκια βρίσκονταν σε HFD. Ο φαινότυπος αυτός μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι τα υψηλά επίπεδα λιπαρών οδηγούν σε ενεργοποίηση των μακροφάγων και της έμφυτης ανοσίας, γενικότερα (Chawla, A. *et al.*, 2011). Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η έλλειψη της *Ercc1* μπορεί να οδηγήσει σε ανοχή στη γλυκόζη δεν έχει προσδιοριστεί.

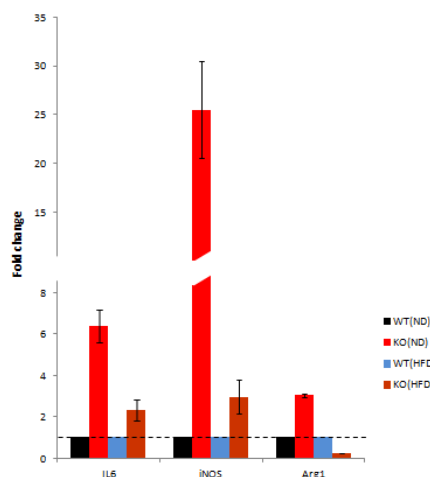


**Εικόνα 5. Μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ποντικών.** Τα ποντίκια όλων των groups υποβάλλονταν σε Glucose Tolerance Test (GTT), ανά δύο μήνες, καθ' όλη τη διάρκεια χορήγησης HFD. Παράλληλα, τα επίπεδα της γλυκόζης μετρήθηκαν και για τα αντίστοιχα ζώα που λάμβαναν κανονική τροφή. **(a)** Στους 2 μήνες από την έναρξη της HFD, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ wild type και knock-out ποντικών, ανεξαρτήτως διατροφής. **(b)** Στους 4 μήνες, τα knock-out ποντίκια που τρέφονταν με HFD, εμφάνισαν περιορισμένη ανοχή στη γλυκόζη, ενώ **(c)** στους 6 μήνες, τα knock-out ζώα, τόσο αυτά που τρέφονταν με κανονική τροφή, όσο και αυτά που λάμβαναν HFD, εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης, σε σχέση με τα αντίστοιχα ποντίκια αγρίου τύπου.



### Λειτουργική ανάλυση των Ercc1-deficient μακροφάγων

Για να μελετήσουμε το μηχανισμό με τον οποίο τα Ercc1-deficient μακροφάγα μεσολαμβάνουν την ανάπτυξη ανοχής στη γλυκόζη, έπρεπε να χαρακτηρίσουμε τις λειτουργικές μεταβολές των μακροφάγων αυτών. Για το σκοπό αυτό, τα ποντίκια όλων των παραπάνω groups ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με θειογλυκολικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση τοπικής φλεγμονής. Μετά από τρεις μέρες, τα περιτοναϊκά μακροφάγα απομονώθηκαν και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για 16-18 ώρες (overnight). Στη συνέχεια, προστέθηκε Trizol, ώστε να γίνει απομόνωση του RNA, αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης και real time PCR. Τα μετάγραφα που μελετήθηκαν αφορούσαν τόσο προφλεγμονώδεις (pro-inflammatory) (IL6, iNOS) όσο και αντιφλεγμονώδεις (anti-inflammatory) αποκρίσεις (Arg1) **(Εικόνα 6)**. Τόσο τα ko ζώα που λάμβαναν ND, όσο και τα ko ζώα που λάμβαναν HFD, είχαν αυξημένα επίπεδα iNOS και IL-6, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα wt, γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη συνεχούς φλεγμονής. Αντίθετα, ενώ στα ζώα του group ND, τα ko φαίνονται να επάγουν και Arg1, τα ko ποντίκια του group HFD, έχουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα Arg1, σε σχέση με τα controls. Συνεπώς, φαίνεται ότι η έλλειψη της Ercc1 στα μακροφάγα έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης και M1 φαινότυπο των μακροφάγων (προ-φλεγμονώδης). Όταν τα μακροφάγα αυτά ενεργοποιούνται, λόγω της αυξημένης πρόσληψης λιπιδίων από την τροφή, έχουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα Arg1 και συνεπώς αδυνατούν να επάγουν αντι-φλεγμονώδη απόκριση, οδηγώντας τελικά σε συνεχή ύπαρξη φλεγμονής. Αυτό, δικαιολογεί και την ενίσχυση της ανοχής στη γλυκόζη που παρουσιάζουν τα ko ποντίκια που λάμβαναν HFD.

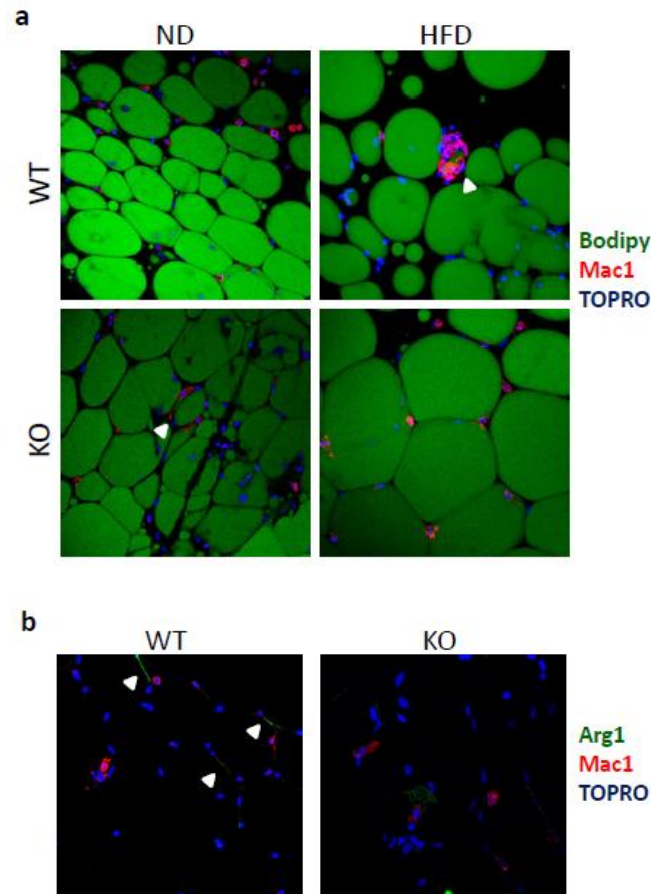


**Εικόνα 6. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με ανοσολογική απόκριση.** Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων mRNA των wild type και knock-out μακροφάγων των ποντικών, τόσο του ND , όσο και του HFD group έγινε για τα προφλεγμονώδη γονίδια IL6, iNOS, και το αντιφλεγμονώδες γονίδιο Arg1. Στην περίπτωση της ND, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων IL6 και iNOS των ko μακροφάγων, μαζί με μικρή αύξηση των επιπέδων Arg1, ως απόκριση στην επαγωγή φλεγμονής. Αντίθετα, τα ko μακροφάγα των ζώων του HFD group είχαν πολύ μικρότερη επαγωγή των προφλεγμονωδών γονιδίων, ενώ τα επίπεδα Arg1 ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των wild type μακροφάγων. Διακεκομμένη γραμμή : επίπεδα mRNA των wild type μακροφάγων.

Για να μελετήσουμε το φαινότυπο αυτό *in vivo*, προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοφθορισμού. Καθώς ο λιπώδης ιστός είναι ένας βασικός ιστός για τη ρύθμιση της μεταβολικής δραστηριότητας του οργανισμού και επειδή έχουμε δείξει παλαιότερα στο εργαστήριο ότι η έλλειψη της Erc1 ειδικά στο λιπώδη ιστό είναι αρκετή για τη δημιουργία μεταβολικών διαταραχών και την επαγωγή φλεγμονής, τα πειράματα επικεντρώθηκαν στον ιστό αυτό.

Αρχικά, μελετήσαμε τη συσσώρευση μακροφάγων στο λιπώδη ιστό. Για το σκοπό αυτό, κάναμε πειράματα ανοσοφθορισμού στο λευκό λιπώδη ιστό (White Adipose Tissue, WAT), χρησιμοποιώντας τη χρωστική Bodipy, η οποία βάφει σταγονίδια λιπιδίων και αντίσωμα για το δείκτη μακροφάγων CD11b (Mac1). Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της real time PCR, τα ko ζώα του group ND είχαν αυξημένα επίπεδα φλεγμονής, όπως φαίνεται από τα πολλά συσσωματώματα μακροφάγων. Αντίθετα, το φαινόμενο αυτό ήταν πιο

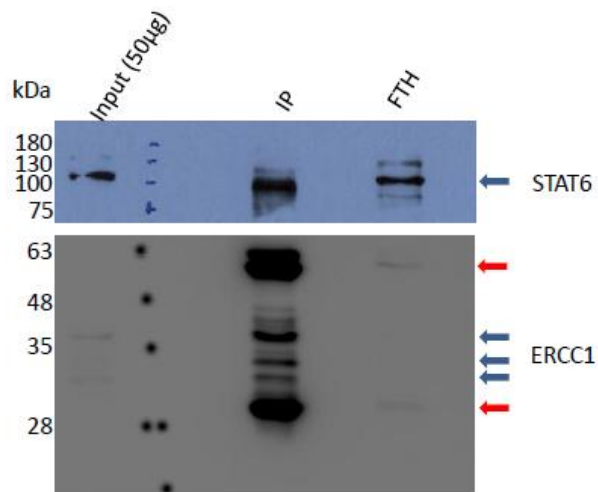
περιορισμένο στα κο ζώα του group HFD (**Εικόνα 7a**). Παρόλα αυτά, υπήρχαν σημάδια φλεγμονής στα κο ζώα του group HFD, όπως φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα Arg, σε σχέση με τα αντίστοιχα wt controls (**Εικόνα 7b**), στα οποία παρατηρήθηκε μεγαλύτερη έκφραση Arg1, πιθανώς ως απόκριση προσαρμογής στην πιο εκτεταμένη φλεγμονή.



**Εικόνα 7. Μεταβολές στη φλεγμονώδη απόκριση απουσία της *Ercs1*.** (a)Υπό φυσιολογική διαίτα, η έλλειψη της *Ercs1* είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή φλεγμονής στο λιπώδη ιστό. Αντίθετα, όταν τα ζώα τρέφονταν με HFD, ο φαινότυπος φλεγμονής αντιστρεφόταν, με τα ζώα αγρίου τύπου να εμφανίζουν περισσότερα σημεία φλεγμονής και (b) παράλληλα μια απόκριση προσαρμογής στην εκτεταμένη φλεγμονή, όπως φαίνεται από την αυξημένη, σε σχέση με τα ko ζώα, Arg1.

### Αλληλεπίδραση της Ercc1 με ανοσολογικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες

Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει ότι η Ercc1 συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών (Karakasilioti, I. *et al.*, 2013). Επίσης, πρωτεΐνες των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA έχουν δείξει ότι συμμετέχουν στις ανοσολογικές αποκρίσεις, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες της ανοσολογικής σηματοδότησης (Roth, S. *et al.*, 2014, Paludan, S. R. and Bowie, A. G., 2013, Chatzinikolaou, G. *et al.*, 2014). Για να ελέγξουμε τη πιθανή συμμετοχή της Ercc1 σε αυτό το μηχανισμό, χρησιμοποιήσαμε πυρηνικά εκχυλίσματα από εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) και κάναμε ανοσοκατακρίμνηση (ImmunoPrecipitation, IP) των πρωτεϊνικών συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η Ercc1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Ercc1 αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα STAT6 (**Εικόνα 8**), ο οποίος είναι ένας από τους βασικούς ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης (Goenka, S. and Kaplan, M. H., 2011). Συνεπώς, η επαγωγή φλεγμονωδών αντιδράσεων που παρουσιάζουν τα Ercc1 ko ποντίκια, μπορεί να οφείλεται και στην άμεση συμμετοχή της Ercc1 στις αποκρίσεις αυτές. Περαιτέρω πειράματα θα χρειαστούν για να προσδιορισθεί ο ακριβής ρόλος της Ercc1 στη ρύθμιση της ανοσολογικής σηματοδότησης και απόκρισης.



**Εικόνα 8. Αλληλεπίδραση της Ercc1 με πρωτεΐνες/ ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης.** Πυρηνικά εκχυλίσματα από εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρίμηση των συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η Ercc1. Η STAT6 εμφανίζεται στο fraction όπου υπάρχει και η Ercc1 (IP), ενώ η παρουσία της στο δείγμα που περιέχει τις πρωτεΐνες που δεν αλληλεπιδρούν με την Ercc1 (Flow through, FTH) οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις της STAT6 που είναι ανεξάρτητες της Ercc1. Μπλε βέλη : ζώνες που αντιστοιχούν στην STAT6 και στις τρεις ισομορφές της Ercc1. Κόκκινα βέλη : IgG.

## Συζήτηση

Η ενδονουκλεάση Ercc1 είναι μια από τις πρωτεΐνες του επιδιορθωτικού μηχανισμού NER. Έλλειψή της οδηγεί σε ένα πολύ σοβαρή και πολύπλοκη παθολογία, με κύριο χαρακτηριστικό το φαινότυπο προγηρίας. Πολλές μελέτες έχουν περιγράψει το μηχανισμό που συνδέει τη γενωμική αστάθεια και τις συστημικές αποκρίσεις που παρατηρούνται στα Ercc1<sup>-/-</sup> ποντίκια. Πρόσφατα, πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο, έδειξαν ότι η έλλειψη της Ercc1 στο λιπώδη ιστό έχει ως αποτέλεσμα τον εκφυλισμό του ιστού, μέσω ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας και την πρόκληση χρόνιας φλεγμονής. Συνεπώς, φάνηκε ότι η δυσλειτουργία επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA και η γενωμική αστάθεια (συσσώρευση γενετικών βλαβών) συνδέεται με την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης. Στην παρούσα μελέτη, μελετήσαμε τις επιπτώσεις της απουσίας της Ercc1 στα κύρια κύτταρα της

έμφυτης ανοσίας, τα μακροφάγα. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε μια νέα σειρά ποντικών, όπου η *Ercc1* έχει απαλοιφθεί στα κύτταρα αυτά. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά, είναι γόνιμα και έχουν παρόμοια ποσοστά μακροφάγων ( $CD11b^+$ ). Σταδιακά όμως, η έλλειψη της *Ercc1* στα μακροφάγα οδήγησε σε φαινοτυπικές μεταβολές. Σε κυτταρικό επίπεδο, τα μακροφάγα των knock-out ποντικών παρουσίαζαν βλάβες του DNA (όπως φάνηκε από την ύπαρξη pATM) και σε επίπεδο οργανισμού, τα ποντίκια αυτά είχαν λιγότερο βάρος από τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Στους 8 μήνες, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη προβλημάτων στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης. Παράλληλα, τα knock-out ζώα παρουσίαζαν σημάδια φλεγμονής στο λιπώδη ιστό, αλλά και τα μακροφάγα από τα ζώα αυτά είχαν αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών γονιδίων. Συμπερασματικά, η απουσία της *Ercc1* και η επακόλουθη γενωμική αστάθεια φαίνεται να οδηγεί σε επαγωγή προφλεγμονωδών γονιδίων από τα μακροφάγα, ως απόκριση στις συσσωρευμένες βλάβες του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την τοπική και ίσως συστημική πρόκληση φλεγμονής, πιθανώς και μέσω της ενεργοποίησης άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα δενδριτικά και τα T κύτταρα. Η ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής θα μπορούσε να εξηγήσει και την ανάπτυξη δυσανεξίας στη γλυκόζη (glucose intolerance), λόγω της καταστολής της έκφρασης του υποδοχέα της ινσουλίνης σε ιστούς όπως το ήπαρ, οι μύες και ο λιπώδης ιστός (Jager, J. *et al.*, 2007).

Είναι γνωστό ότι τα μακροφάγα συμμετέχουν στη ρύθμιση μεταβολικών διεργασιών και στην ανάπτυξη μεταβολικών διαταραχών (Neels, J. G. and Olefsky, J. M., 2006). Επίσης, η ανάπτυξη παχυσαρκίας έχει συσχετισθεί με την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας και τη χρόνια φλεγμονή (Chawla, A. *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, η αυξημένη συγκέντρωση λιπαρών οξέων οδηγεί σε ενεργοποίηση των μακροφάγων έμμεσα, λόγω έκκρισης κυτοκινών από τον λιπώδη ιστό, αλλά και άμεσα, μέσω ενεργοποίησης των TLR4 και TLR2 υποδοχέων των μακροφάγων (Nguyen, M. T. *et al.*, 2007, Yu, C. *et al.*, 2002). Έτσι, χορηγήσαμε στα ποντίκια τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (High Fat Diet, HFD), ώστε να . Σε αντίθεση με τα ζώα που καταλάωναν

κανονική τροφή, τα knock-out ποντίκια του HFD group παρουσίασαν αύξηση του βάρους τους, σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Επίσης, το πρόβλημα ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης των knock-out ζώων ήταν πιο έντονο και εμφανιζόταν πιο σύντομα, μετά από 4 μήνες από την έναρξη χορήγησης της HFD. Σε αντίθεση με τα ζώα που λάμβαναν κανονική τροφή, τα knock-out ποντίκια του HFD group είχαν πιο περιορισμένα σημάδια φλεγμονής και χαμηλότερα επίπεδα προφλεγμονοδών γονιδίων. Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα και το φαινότυπο των ποντικών, φάνηκε ότι όταν τα *Erc1*-deficient μακροφάγα ενεργοποιήθηκαν (άμεσα ή έμμεσα) από την παρουσία υψηλών επιπέδων λιπαρών οξέων, η γενωμική αστάθεια των κυττάρων αυτών, είχε ως αποτέλεσμα την ανοσοκαταστολή και την πρόκληση παχυσαρκίας.

Συνεπώς, περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για τη διαλεύκανση του ρόλου της *Erc1* στη λειτουργία των μακροφάγων και στην ανοσολογική απόκριση. Για παράδειγμα, η αιτιολόγηση του φαινοτύπου των HFD ποντικών, απαιτεί την μελέτη των μακροφάγων και σε άλλους, μεταβολικά ενεργούς ιστούς, όπως το ήπαρ και ο μυς, καθώς η ανάπτυξη υπεργλυκαιμίας συνδέεται και με τη φλεγμονή και απορρύθμιση των ιστών αυτών. Επίσης, η μελέτη του ρόλου της *Erc1* στα μακροφάγα χρειάζεται να μελετηθεί ως προς την ικανότητα των μακροφάγων να ενεργοποιούνται, να αποκρίνονται και να καταστέλλουν τη φλεγμονή.

Τέλος, σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η ταυτοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της *Erc1* στα μακροφάγα, θα δώσει πολλές πληροφορίες για τη λειτουργία της για τη λειτουργικότητα των μακροφάγων και τη ρύθμιση της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Η ανάπτυξη τεχνολογίας *in vivo* βιοτινιλύωσης στο εργαστήριό μας, σε συνδυασμό με ανάλυση φασματομετρίας μάζας (Mass spectrometry, MS), θα προσδιορίσει πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της *Erc1* στο πλαίσιο του ανοσοποιητικού συστήματος. Όλα τα παραπάνω θα συμβάλουν στην περιγραφή της σύνδεσης της *Erc1* και της γενωμικής αστάθειας με τη ρύθμιση και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος

και του μηχανισμού που τελικά οδηγεί στον σύνθετο φαινότυπο πρόωρης γήρανσης.

## Βιβλιογραφία

Andressoo, J.O., Hoeijmakers, J.H., and Mitchell, J.R. (2006). Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell cycle* 5, 2886-2888.

Chatzinikolaou, G., Karakasilioti, I., and Garinis, G.A. (2014). DNA damage and innate immunity: links and trade-offs. *Trends in immunology* 35, 429-435.

Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* 11, 738-749.

Chen, Q., Liu, K., Robinson, A.R., Clauson, C.L., Blair, H.C., Robbins, P.D., Niedernhofer, L.J., and Ouyang, H. (2013). DNA damage drives accelerated bone aging via an NF-kappaB-dependent mechanism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28, 1214-1228.

Cheo, D.L., Ruven, H.J., Meira, L.B., Hammer, R.E., Burns, D.K., Tappe, N.J., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., and Friedberg, E.C. (1997). Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. *Mutation research* 374, 1-9.

Cho, I., Tsai, P.F., Lake, R.J., Basheer, A., and Fan, H.Y. (2013). ATP-dependent chromatin remodeling by Cockayne syndrome protein B and NAP1-like histone chaperones is required for efficient transcription-coupled DNA repair. *PLoS genetics* 9, e1003407.

Citterio, E., Rademakers, S., van der Horst, G.T., van Gool, A.J., Hoeijmakers, J.H., and Vermeulen, W. (1998). Biochemical and biological characterization of wild-type and ATPase-deficient Cockayne syndrome B repair protein. *The Journal of biological chemistry* 273, 11844-11851.

Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H., and Vermeulen, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Molecular and cellular biology* 20, 7643-7653.

Citterio, E., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Transcriptional healing. *Cell* 101, 447-450.



Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic research* 8, 265-277.

de Boer, J., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.

Fong, Y.W., Inouye, C., Yamaguchi, T., Cattoglio, C., Grubisic, I., and Tjian, R. (2011). A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell* 147, 120-131.

Garinis, G.A., Mitchell, J.R., Moorhouse, M.J., Hanada, K., de Waard, H., Vandeputte, D., Jans, J., Brand, K., Smid, M., van der Spek, P.J., et al. (2005). Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *The EMBO journal* 24, 3952-3962.

Garinis, G.A., and Schumacher, B. (2009). Transcription-blocking DNA damage in aging and longevity. *Cell cycle* 8, 2134-2135.

Garinis, G.A., Uittenboogaard, L.M., Stachelscheid, H., Fousteri, M., van Ijcken, W., Breit, T.M., van Steeg, H., Mullenders, L.H., van der Horst, G.T., Bruning, J.C., et al. (2009). Persistent transcription-blocking DNA lesions trigger somatic growth attenuation associated with longevity. *Nature cell biology* 11, 604-615.

Garinis, G.A., van der Horst, G.T., Vijg, J., and Hoeijmakers, J.H. (2008). DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nature cell biology* 10, 1241-1247.

Gasser, S., and Raulet, D.H. (2006). The DNA damage response arouses the immune system. *Cancer research* 66, 3959-3962.

Goenka, S., and Kaplan, M.H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunologic research* 50, 87-96.

Guo, R., Chen, J., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2011). GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic acids research* 39, 1390-1397.

Hasan, S., Hassa, P.O., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2001). Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* 410, 387-391.

Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2007). Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241-251.

Jaspers, N.G., Raams, A., Silengo, M.C., Wijgers, N., Niedernhofer, L.J., Robinson, A.R., Giglia-Mari, G., Hoogstraten, D., Kleijer, W.J., Hoeijmakers, J.H., et al. (2007). First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *American journal of human genetics* 80, 457-466.

Kamileri, I., Karakasilioti, I., and Garinis, G.A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends in genetics : TIG* 28, 566-573.

Kamileri, I., Karakasilioti, I., Sideri, A., Kosteas, T., Tatarakis, A., Talianidis, I., and Garinis, G.A. (2012). Defective transcription initiation causes postnatal growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2995-3000.

Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.L., Rapic-Otrin, V., and Levine, A.S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2588-2593.

Karakasilioti, I., Kamileri, I., Chatzinikolaou, G., Kosteas, T., Vergadi, E., Robinson, A.R., Tsamardinos, I., Rozgaja, T.A., Siakouli, S., Tsatsanis, C., et al. (2013). DNA damage triggers a chronic autoinflammatory response, leading to fat depletion in NER progeria. *Cell metabolism* 18, 403-415.

Le May, N., Mota-Fernandes, D., Velez-Cruz, R., Iltis, I., Biard, D., and Egly, J.M. (2010). NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Molecular cell* 38, 54-66.

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 465-481.

McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D.J., Squires, S., and Melton, D.W. (1993). Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nature genetics* 5, 217-224.

Murai, M., Enokido, Y., Inamura, N., Yoshino, M., Nakatsu, Y., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Tanaka, K., and Hatanaka, H. (2001). Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13379-13384.

Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2006). Inflamed fat: what starts the fire? *The Journal of clinical investigation* 116, 33-35.

Nguyen, M.T., Faveyukis, S., Nguyen, A.K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 282, 35279-35292.

Niedernhofer, L.J. (2008). Nucleotide excision repair deficient mouse models and neurological disease. *DNA repair* 7, 1180-1189.

Niedernhofer, L.J., Garinis, G.A., Raams, A., Lalai, A.S., Robinson, A.R., Appeldoorn, E., Odijk, H., Oostendorp, R., Ahmad, A., van Leeuwen, W., et al. (2006). A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* 444, 1038-1043.

Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H., et al. (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 24, 5776-5787.

Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A.B., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2009). UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA repair* 8, 767-776.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., et al. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56, 1517-1526.

Paludan, S.R., and Bowie, A.G. (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity* 38, 870-880.

Prasher, J.M., Lalai, A.S., Heijmans-Antonissen, C., Ploemacher, R.E., Hoeijmakers, J.H., Touw, I.P., and Niedernhofer, L.J. (2005). Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *The EMBO journal* 24, 861-871.

Rodier, F., Coppe, J.P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A., Munoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 11, 973-979.

Roth, S., Rottach, A., Lotz-Havla, A.S., Laux, V., Muschawekh, A., Gersting, S.W., Muntau, A.C., Hopfner, K.P., Jin, L., Vannest, K., et al. (2014). Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1beta production. *Nature immunology* 15, 538-545.

Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Chambon, P., and Egly, J.M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 260, 58-63.

Schmitz, K.M., Schmitt, N., Hoffmann-Rohrer, U., Schafer, A., Grummt, I., and Mayer, C. (2009). TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Molecular cell* 33, 344-353.

Schumacher, B., van der Pluijm, I., Moorhouse, M.J., Kosteas, T., Robinson, A.R., Suh, Y., Breit, T.M., van Steeg, H., Niedernhofer, L.J., van Ijcken, W., et al. (2008). Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms. *PLoS genetics* 4, e1000161.

Tsodikov, O.V., Ivanov, D., Orelli, B., Staresincic, L., Shoshani, I., Oberman, R., Scharer, O.D., Wagner, G., and Ellenberger, T. (2007). Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *The EMBO journal* 26, 4768-4776.

van der Horst, G.T., Meira, L., Gorgels, T.G., de Wit, J., Velasco-Miguel, S., Richardson, J.A., Kamp, Y., Vreeswijk, M.P., Smit, B., Bootsma, D., et al. (2002). UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (Csa) mutant mice. *DNA repair* 1, 143-157.

van der Pluijm, I., Garinis, G.A., Brandt, R.M., Gorgels, T.G., Wijnhoven, S.W., Diderich, K.E., de Wit, J., Mitchell, J.R., van Oostrom, C., Beems, R., et al. (2007). Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone--insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome. *PLoS biology* 5, e2.

Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular cell* 22, 383-394.

Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C.J., Nigg, A., van Steeg, H., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1997). Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Current biology : CB* 7, 427-439.

Yeh, J.I., Levine, A.S., Du, S., Chinte, U., Ghodke, H., Wang, H., Shi, H., Hsieh, C.L., Conway, J.F., Van Houten, B., et al. (2012). Damaged DNA induced UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) dimerization and its roles in chromatinized DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E2737-2746.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of biological chemistry* 277, 50230-50236.